

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/81, 15/00, C12Q 1/68, C12N 1/19, C12Q 1/18		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/44135
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	8. Oktober 1998 (08.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01904		KÖTTER, Peter [DE/DE]; Industriestrasse 3A, D-61440 Oberursel (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 2. April 1998 (02.04.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 13 572.2 2. April 1997 (02.04.97) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HINNEN, Albert [DE/DE]; Scheidlerstrasse 17, D-07745 Jena (DE). HEGEMANN, Johannes [DE/DE]; In den Gärten 33, D-35398 Giessen (DE). MUNDER, Thomas [DE/DE]; Engelplatz 3, D-07743 Jena (DE). SCHUSTER, Tilmer [DE/DE]; Eichenweg 40, D-97440 Wernke (DE). FELDMANN, Horst [DE/DE]; Pasinger Heuweg 86, D-80999 München (DE). KRAMER, Wilfried [DE/DE]; Strasse an der St. Vinzenz Kirche 10, D-37077 Göttingen (DE). ZIMMERMANN, Friedrich, Karl [DE/DE]; Goethestrasse 12, D-64372 Ober-Ramstadt (DE). ENTIAN, Karl-Dieter [DE/DE]; Oberurseler Strasse 43, D-61440 Oberursel (DE). ROSE, Matthias [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 4, D-61267 Neu-Anspach (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: METHOD FOR SCREENING ANTIMYCOTICALLY ACTIVE SUBSTANCES			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SCREENING VON ANTIMYKOTISCH WIRKENDEN SUBSTANZEN			
(57) Abstract <p>The invention relates to a method for screening antimycotically active substances, whereby essential genes from mycetes, especially of <i>Saccaromyces cerevisiae</i>, and functionally homologous and/or sequentially homologous mycetes genes are used as targets. Said method is thus characterized in that essential genes from mycetes are used as targets.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screening von antimykotisch wirksamen Substanzen, wobei essentielle Gene aus Myceten, insbesondere von <i>Saccaromyces cerevisiae</i> sowie funktionshomologe und/oder sequenzhomologe Mycetengene als Targets eingesetzt werden. Verfahren zum Auffinden von antimykotisch wirkenden Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß essentielle Gene aus Myceten als Targets eingesetzt werden.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zum Screening von antimykotisch wirkenden Substanzen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screening von antimykotisch wirksamen Substanzen, wobei essentielle Gene aus Myceten, insbesondere von *Saccharomyces cerevisiae* sowie funktionshomologe und/oder sequenzhomologe Mycetengene als Targets eingesetzt werden.

Das Spektrum der bekannten Pilzinfektionen reicht von Pilzbefällen an der Hautoberfläche oder der Nägel bis hin zu potentiell lebensbedrohlichen mykotischen Infektionen der inneren Organe. Derartige Infektionen und damit einhergehende Folgeerkrankungen, werden als Mykosen bezeichnet.

Zur Behandlung von Mykosen werden antimykotisch (fungistatisch oder fungizid) wirkende Substanzen eingesetzt. Bisher gibt es aber nur relativ wenige pharmakologisch wirksame Substanzen, wie beispielsweise Amphotericin B, Nystatin, Pimaricin, Griseofulvin, Clotrimazol, 5-Fluorcytosin und Batraphen. Die medikamentöse Behandlung von Pilzinfektionen ist außerordentlich schwierig, insbesondere deshalb, weil es sich sowohl bei den Myceten als auch bei den Wirtszellen um eukaryotische Zellen handelt. Die Einnahme von Arzneimitteln, die die bekannten antimykotischen Wirkstoffe enthalten ist deshalb oft mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden, beispielsweise wirkt Amphotericin B nephrotoxisch. Es besteht also ein starker Bedarf an pharmakologisch wirksamen Substanzen, die zur Herstellung von Medikamenten eingesetzt werden können, die bei einer Schwächung des Immunsystems prophylaktisch oder im Falle einer bereits vorliegenden Infektion zur Behandlung von Mykosen eingesetzt werden können. Dabei sollten die Substanzen ein spezifisches Wirkprofil aufweisen, so daß selektiv das Wachstum und die Vermehrung von Myceten verhindert werden kann, ohne dabei den Wirtsorganismus zu schädigen.

Für die Identifizierung antimykotisch wirksamer Substanzen fehlt es bisher an kompatiblen, aussagekräftigen Testverfahren.

In WO 95/11969 wird ein Verfahren zum Screening von antimykotischen Substanzen beschrieben, wobei der Effekt von zu testenden Substanzen auf die Translation eines Proteins als Maß für die Wirkung der zu testenden Substanz bestimmt wird.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Identifizierung von antimykotisch wirkenden Substanzen zu entwickeln, welches möglichst universell einsetzbar ist und die Testung einer Vielzahl von potentiellen Wirkstoffen in einer möglichst effektiven Weise ermöglicht.

Ein wesentliches Merkmal des Verfahrens ist, daß essentielle Gene aus Myceten als Targets für das Screening verwendet werden. Dieses Verfahren unterscheidet sich insbesondere dadurch von bekannten Verfahren, daß keine detaillierten Kenntnisse über die biochemische Funktion des durch das essentielle Gen kodierten Proteins notwendig sind.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von antimykotisch wirkenden Substanzen, wobei essentielle Gene aus Myceten und/oder die Genprodukte dieser essentiellen Gene als Targets eingesetzt werden. Insbesondere werden antimykotisch wirkende Substanzen dadurch aufgefunden, daß sie die funktionelle Expression der essentiellen Gene (Transkription und Translation) aus Myceten oder die funktionelle Aktivität der kodierten Proteine ganz oder teilweise inhibieren.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Auffinden von antimykotisch wirkenden Substanzen, wobei in dem Verfahren

- a) eine Nukleinsäure, die die Expression eines essentiellen Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* kontrolliert und/oder die für ein essentielles Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* oder einen Teil desselben kodiert oder das kodierte essentielle Protein selbst oder
- b) eine andere Nukleinsäure, die die Expression eines zu dem unter a) genannten Proteins funktionsähnlichen Proteins aus einer anderen Mycetenspezies kontrolliert und/oder die für ein zu dem unter a) genannten Protein funktionsähnliches Protein aus einer anderen Mycetenspezies kodiert oder das kodierte funktionsähnliche

Protein selbst als Target eingesetzt wird, wobei dann entweder

a) der Effekt einer zu untersuchenden Substanz auf die Expression des essentiellen Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* oder die funktionelle Aktivität des kodierten essentiellen Proteins selbst oder

b) der Effekt einer zu untersuchenden Substanz auf die Expression des funktionsähnlichen Proteins aus einer anderen Mycetenspezies oder die funktionelle Aktivität des kodierten funktionsähnlichen Proteins selbst bestimmt wird.

In einer Ausführungsform des Verfahrens ist die Nukleinsäure ein essentielles Gen oder ein Teil desselben, beispielsweise der Promotor des essentiellen Gens oder ein Enhancer des essentiellen Gens.

Die Erfindung beinhaltet, daß essentielle Gene in Myceten identifiziert werden, die dann in dem Screeningverfahren eingesetzt werden können.

Die Erfindung beinhaltet, daß zuerst essentielle Gene in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden. Die Erfindung beinhaltet auch, daß ausgehend von identifizierten essentiellen Genen in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) funktionsähnliche Gene in anderen Myceten identifiziert werden. Diese funktionsähnlichen Genen können gegebenenfalls essentielle Gene in anderen Myceten sein.

Um essentielle Gene in *S. cerevisiae* zu identifizieren, werden einzelne Gene von *S. cerevisiae* durch homologe Rekombination aus dem Genom der *S. cerevisiae* entfernt. Handelt es sich bei dem entfernten DNA-Abschnitt um ein essentielles Gen, dann ist die Deletion letal für die *S. cerevisiae* Zellen.

Um entsprechende Deletionen im Genom von *S. cerevisiae* zu erzeugen und solche *S. cerevisiae* Zellen, die die Deletion tragen selektionieren zu können, wird eine Methode verwendet, bei dem das zu untersuchende *S. cerevisiae* Gen durch ein Markergen ersetzt wird. Über dieses Markergen (Gen eines Selektionsmarkers) können die Zellen selektioniert werden, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, da bei ihnen das zu untersuchende Gen durch das Gen eines

Selektionsmarkers ersetzt worden ist. Als Selektionsmarker können z. B. dominante Selektionsmarker oder Auxotrophiemarker verwendet werden.

Als Auxotrophiemarker werden Gene benutzt, die für Schlüsselenzyme der Aminosäure- oder Nukleobasen-Synthesewege kodieren. Beispielsweise können *S. cerevisiae* Gene die für Enzyme aus dem Aminosäurestoffwechsel von Leucin (z. B. LEU2-Gen), Histidin (z. B. HIS3-Gen) oder Tryptophan (z. B. TRP1-Gen) oder aus dem der Stoffwechsel der Nukleobase Uracil (z. B. URA3-Gen) kodieren, als Marker verwendet werden.

Das Verfahren beinhaltet, daß auxotrophe *S. cerevisiae* Zellen bzw. Stämme verwendet werden können, d. h. Zellen bzw. Stämme, in denen das für den jeweils verwendeten Marker kodierende Gen ein oder mehrere Mutationen aufweist, wodurch gewährleistet wird, daß kein funktionell aktives Enzym exprimiert wird. Diese auxotrophen Zellen bzw. Stämme können nur in Nährmedien wachsen, in denen die entsprechenden Aminosäuren oder Nukleobasen enthalten sind. Als Stämme können beispielsweise alle *S. cerevisiae* Laborstämme verwendet werden, die Auxotrophie- und/oder Nukleobasen-Marker besitzen. Werden diploide *S. cerevisiae* Zellen bzw. Stämme eingesetzt dann, müssen die entsprechenden Markergene homozygot mutiert vorliegen. Insbesondere wird der Stamm CEN.PK2 (Scientific Research & Development GmbH, Oberursel, Deutschland) oder isogene Derivate dieses Stamms eingesetzt.

Das Verfahren beinhaltet auch, daß *S. cerevisiae* Zellen bzw. Stämme verwendet werden, die keine geeigneten Auxotrophiemarker besitzen beispielsweise prototrophe *S. cerevisiae* Zellen bzw. Stämme. Dann können dominante Selektionsmarker, beispielsweise Resistenzgene, wie das Kanamycin-Resistenzgen als Marker eingesetzt werden.

Für die homologe Rekombination, bei der in Genen von *S. cerevisiae* die DNA-Sequenz des zu untersuchenden *S. cerevisiae* Gens ganz oder teilweise durch die Sequenz des Markergens ersetzt wird, werden DNA-Fragmente eingesetzt, bei denen das Markergen am 5'- und am 3'-Ende von Sequenzen flankiert wird, die zu

Sequenz-Abschnitten am 5'- und 3'-Ende des zu untersuchenden *S. cerevisiae* Gens homolog sind.

Für die Herstellung entsprechender DNA-Fragmente sind verschiedene Verfahren möglich, die zur Deletion spezifischer *S. cerevisiae* Gene etwa gleich gut geeignet sind. Für die Transformation in eine geeignete *S. cerevisiae* Zelle bzw. einen Stamm wird ein lineares DNA-Fragment eingesetzt. Dieses wird durch die homologe Rekombination ins *S. cerevisiae* Genom integriert.

In dem Verfahren können drei verschiedene Methoden verwendet werden:

1. "Klassische Methode" zur Erzeugung von Deletionskassetten (Rothstein, R. J. (1983) *Methods in Enzymology* Vol. 101, 202 - 211).
2. "Klassische Methode" unter Verwendung der PCR-Technik ("Modifizierte Klassische Methode").
3. SFH (short flanking homology)-PCR-Methode (Wach, A. et al. (1994) *Yeast* 10: 1793 - 1808; Güldner, U. et al. (1996) *Nucleic Acids Research* 24: 2519 - 2524).

1. Bei der "Klassischen Methode" zur Erzeugung von Deletionskassetten im *S. cerevisiae* Genom liegt das zu untersuchende Gen entweder bereits in einem geeigneten Vektor vor oder es wird in einen solchen integriert. Bei dieser Methode können beispielsweise alle pBR-, pUC- und pBluescript®-Derivate verwendet werden. Aus diesen Vektoren wird, z. B. unter Verwendung geschickt ausgewählter Restriktionsschnittstellen, ein Großteil der Sequenz des zu untersuchenden Gens entfernt, wobei aber die 5'- und 3'-Bereiche des zu untersuchenden Gens im Vektor verbleiben. Zwischen diese verbleibenden Bereiche wird das Gen des ausgewählten Selektionsmarkers integriert.

2. Bei einer modifizierten Form dieser "Klassischen Methode" wird die PCR-Technik eingesetzt. Bei dieser Methode werden die Bereiche des zu untersuchenden *S. cerevisiae* Gens, die sich am 3'- beziehungsweise 5'-Ende der

kodierenden Sequenz befinden mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert. Bei diesem Verfahren werden ausschließlich die Randbereiche beidseitig des zu untersuchenden Gens amplifiziert, weshalb für jedes zu untersuchende Gen zwei PCR-Reaktionen durchgeführt werden müssen, wobei einmal das 5'- und einmal das 3'-Ende des Gens amplifiziert wird. Die Länge der amplifizierten DNA-Abschnitte der Randbereiche hängt beispielsweise von den in diesen Bereichen vorhandenen Restriktionsschnittstellen ab. Die amplifizierten Randbereiche des zu untersuchenden Gens haben in der Regel eine Länge von 50 bis 5000 Basenpaaren, besonders bevorzugt eine Länge zwischen 500 und 1000 Basenpaaren (Bp).

Als Template für die PCR-Reaktion kann beispielsweise genomische DNA aus *S. cerevisiae* eingesetzt werden. Als Template für die PCR-Reaktionen können Wildtyp-Gene oder modifizierte Wildtyp-Gene verwendet werden. Die Primer-Paare (jeweils ein Sense- und ein Antisense-Primer) werden so konstruiert, daß sie Sequenz-Abschnitten am 3'- bzw. 5'-Ende des zu untersuchenden *S. cerevisiae* Gens entsprechen. Insbesondere werden die Primer so gewählt, daß eine Integration über geeignete Restriktionsschnittstellen in den Vektor möglich ist.

Als Vektoren können Derivate des pUC-, pBR- und pBluescript®-Vektors eingesetzt werden. Insbesondere sind Vektoren geeignet, die bereits ein Gen, das für einen Selektionsmarker kodiert, enthalten. Insbesondere können hierzu Vektoren verwendet werden, die die Gene der Selektionsmarker HIS3, LEU2, TRP1 oder URA3 enthalten. Beispielsweise können hierzu die Plasmide pPK5/6 (SEQ ID NO. 18), pPK7/8 (SEQ ID NO. 19), pPK9/10 (SEQ ID. NO. 20) und pPK13/14 (SEQ ID NO. 21) verwendet werden. Die Nukleotidsequenz der Plasmide pPK5/6, pPK7/8, pPK9/10 und pPK13/14 ist im Sequenzprotokoll angegeben. Die Herstellung dieser Plasmide ist in den Beispielen 2 bis 6 beschrieben.

Die mittels PCR erzeugten DNA-Abschnitte des zu untersuchenden *S. cerevisiae* Gens werden beiderseits des im Vektor bereits vorhandenen Gens, das für den Selektionsmarker kodiert, in den Vektor integriert, so daß anschließend, wie bei der "Klassischen Methode", der verwendete Selektionsmarker beidseitig von homologen

DNA-Sequenzen des zu untersuchenden Gens flankiert vorliegt.

3. Da überraschenderweise die homologe Rekombination an *S. cerevisiae* sehr effizient und präzise verläuft, kann die Länge der zu dem zu untersuchenden *S. cerevisiae* Gen homologen DNA-Abschnitte, die das Gen des Selektionsmarkers flankieren, gegebenenfalls deutlich kürzer gewählt werden als bei der "Modifizierten Klassischen Methode". Die flankierenden, zu dem zu untersuchenden Gen homologen Bereiche brauchen nur eine Länge von etwa 20 - 60 Basenpaaren, besonders bevorzugt von 30 - 45 Basenpaaren, aufzuweisen. Besonders vorteilhaft an der SFH-PCR-Methode ist, daß aufwendige Klonierungsschritte entfallen.

An einem DNA-Template, daß das Gen für den zu verwendenden Selektionsmarker enthält, wird eine PCR-Reaktion durchgeführt, wobei die verwendeten Primer so konstruiert werden, daß die DNA-Sequenz des Sense-Primers dem 5'-Ende der Sequenz des Selektionsmarkers homolog ist und daß der Primer zusätzlich an seinem 5'-Ende einen vorzugsweise 40 Nukleotide langen Bereich aufweist, der der Sequenz am 5'-Ende des zu untersuchenden *S. cerevisiae* Gens entspricht. Analog wird der Antisense-Primer so konstruiert, daß er zu dem 3'-Ende der Sequenz des Gens des Selektionsmarkers komplementär ist, wobei dieser Primer an seinem 5'-Ende einen vorzugsweise ebenfalls 40 Nukleotide langen Bereich enthält, der der Sequenz am 3'-Ende des zu untersuchenden Gens entspricht.

Für die Amplifikation von zu untersuchenden *S. cerevisiae* Genen mit Hilfe der SFH-PCR-Methode werden beispielsweise Vektoren verwendet, die bereits das Gen für einen Auxotrophie- oder einen Selektionsmarker enthalten. Insbesondere wird das Plasmid pUG6 als Template verwendet. Dieses Plasmid enthält eine loxP-KanMX-loxP Kasette (Güldener, U. et al. (1996) Nucleic Acids Research 24: 2519 - 2524). Das heißt, ein Kanamycin-Resistenzgen ist beidseitig von einer loxP-Sequenz (loxP-KanMX-loxP Kasette) flankiert. Die Verwendung dieser Kasette hat den Vorteil, daß nach der Integration der loxP-KanMX-loxP Kasette an den Genort an dem das zu untersuchende *S. cerevisiae* Gen lokalisiert war, das Kanamycin-Resistenzgen gegebenenfalls wieder aus dem *S. cerevisiae* Genom entfernt werden kann. Dafür kann die Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 verwendet werden.

Die Cre-Rekombinase erkennt die loxP-Sequenzen und entfernt die zwischen den beiden loxP-Sequenzen liegende DNA durch einen homologen Rekombinationsprozeß. Als Ergebnis bleibt nur eine loxP-Sequenz zurück und es kommt zur sogenannten Marker-Rückgewinnung, d. h. der *S. cerevisiae* Stamm kann erneut mit loxP-KanMX-loxP Kasette transformiert werden. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn zwei oder mehrere funktionshomologe Gene deletieren werden sollen, um einen letalen Phänotyp zu erhalten.

Bei der SFH-PCR-Methode werden in der PCR-Reaktion Primer verwendet, die an ihrem 3'-Ende einen vorzugsweise etwa 20 Nukleotide langen Bereich aufweisen, der zu Sequenzen links beziehungsweise rechts von der loxP-KanMX-loxP Kasette homolog ist, wobei die Primer jeweils an ihrem 5'-Ende einen vorzugsweise 40 Nukleotide langen Bereich aufweisen, der Sequenzabschnitten an den Enden des zu untersuchenden Gens homolog ist.

Mit allen drei Methoden werden lineare Deletionskassetten erhalten, die das Gen für einen ausgewählten Selektionsmarker enthalten, der beidseitig von homologen Sequenzen des zu untersuchenden Gens flankiert wird. Diese Deletionskassetten werden für die Transformation diploider *S. cerevisiae* Stämme eingesetzt. Beispielsweise kann hierfür der diploide *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK2 (Scientific Research & Development GmbH, Oberursel, Deutschland) verwendet werden.

CEN.PK2 Mata/MAT α ura3-52/ura3-52 leu2-3, 112/leu2-3, 112 his3 Δ 1/his3 Δ 1
trp1-289/trp1-289 MAL2-8^c/MAL2-8^c SUC2/SUC2

Der Stamm CEN.PK2 wird nach bekannten Verfahren angezogen und kultiviert (Gietz, R. D. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 8: 1425; Güldener, U. et al. (1996) *Nucleic Acids Research* 24: 2519 - 2524).

Die Zellen des verwendeten *S. cerevisiae* Stammes werden mit einer entsprechenden Menge DNA der linearen Deletionskasette nach bekannten Verfahren transformiert (beispielsweise Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Danach wird das Medium

in dem die Zellen kultiviert werden gegen neues Medium, sogenanntes Selektivmedium, das die entsprechende Aminosäure (beispielsweise Histidin, Leucin oder Tryptophan) oder Nukleobase (beispielsweise Uracil) nicht enthält bzw. bei Verwendung einer Deletionskassette die das Kanamycin-Resistenzgen enthält, in Medien mit Geneticin (G418®) kultiviert. Alternativ können die transformierten Zellen auf mit entsprechendem Medium hergestellten Agarplatten ausplattiert werden. Auf diese Weise werden die Transformanten selektioniert, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, da nur diese Zellen unter den veränderten Bedingungen wachsen können.

In den meisten Fällen wird bei der Transformation einer diploiden *S. cerevisiae* Zelle bzw. eines Stammes aber nur eine der beiden in dem doppelten Chromosomensatz vorliegenden Kopien des zu untersuchenden Gens durch die DNA der Deletions-Kassette ersetzt, so daß eine heterozygot-diploide *S. cerevisiae* Zelle bzw. ein heterozygot-diploider *S. cerevisiae* Mutantenstamm entsteht, bei der/dem eine Kopie des zu untersuchenden Gens durch das Gen des Selektionsmarkers ersetzt wird, während die andere Kopie des zu untersuchenden Gens im Genom erhalten bleibt. Das hat den Vorteil, daß falls auf diese Weise ein essentielles Gen deletiert wird, die heterozygot-diploide Zelle bzw. der *S. cerevisiae* Mutantenstamm aufgrund der noch vorhandenen zweiten Kopie des essentiellen Gens weiterhin lebensfähig ist.

Die korrekte Integration der DNA der Deletionskassette an den vorbestimmten chromosomalen Genlocus (Genlocus des zu untersuchenden Gens) kann gegebenenfalls mit Hilfe der Southern-Blot-Analyse (Southern, E. M. (1975) J. Mol. Biol. 98: 503 - 517) oder mit Hilfe der diagnostischen PCR-Analyse unter Verwendung spezifischer Primer überprüft werden (Güldener, U. et al. (1996) Nucleic Acids Research 24: 2519 - 2524).

Die genetische Aufspaltung einzelner diploider Zellen läßt sich mit einer Tetradenanalyse verfolgen. Dazu werden diploide Stämme, insbesondere heterozygot-diploide Mutantenstämme, mit Hilfe von bekannten Verfahren zur Reduktionsteilung (Meiose) angeregt, beispielsweise durch Stickstoffverarmung auf

Kaliumacetat-Platten (Sherman, F. et al. (1986) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Guthrie, C. und Fink, G. R. (1991) Methods in Enzymology. Volume 194. Academic Press, San Diego, 3 - 21; Ausubel, F. M. et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Chapter 13). Die Meiose resultiert in Asci mit vier Ascosporen (Segreganten), die nach enzymatischen Partialverdauung der Ascussporenwand mit Zymolyase (Ausubel et al. (1987)) mit Hilfe eines Mikromanipulators (z.B. Firma SINGER) vereinzelt werden können. Wird beispielsweise ein heterozygot-diploider Mutantenstamm, bei dem ein essentielles Gen im doppelten Chromosomensatz durch die homologe Rekombination ausgetauscht wurde einer Tetraden-Analyse unterzogen, dann überleben nur zwei Segreganten, nämlich die, die das essentielle Gen noch tragen. Die beiden anderen Segreganten sind nicht lebensfähig, weil bei ihnen das zu untersuchende, in diesem Fall essentielle Gen, fehlt.

Zur Verifikation, ob die auf diese Weise untersuchten Gene tatsächlich essentiell sind oder ob dem Genlocus des zu untersuchenden Gens benachbarte, möglicherweise essentielle Gene durch die homologe Rekombination "beschädigt" wurden, werden die heterozygot-diploiden *S. cerevisiae* Mutantenstämme mit einem Centromerplasmid, in dem das zu untersuchende Gen vorliegt, transformiert. Die Transformanten werden einer Tetraden-Analyse unterzogen. Werden dann wieder vier anstelle von zwei lebensfähigen Segreganten erhalten, so kann das im Centromerplasmid vorliegende zu untersuchende Gen den Defekt der zwei nicht lebensfähigen haploiden *S. cerevisiae* Zellen/Mutantenstämme komplementieren, womit bewiesen ist, daß das untersuchte *S. cerevisiae* Gen essentiell ist.

Vorzugsweise werden als Centromerplasmide Plasmide verwendet, die in niedriger Kopienzahl, beispielsweise in 1 oder 2 Kopien pro Zelle vorliegen. Beispielsweise können hierzu die Plasmide pRS313, pRS314, pRS315 und pRS316 (Sikorski, R. S. und Hieter, P. (1989) Genetics 122: 19 - 27) oder ähnliche Plasmide verwendet werden. Dabei werden die zu untersuchenden Gene vorzugsweise einschließlich ihrer 5'- und 3'-nichtkodierenden Bereiche in diese Plasmide integriert.

Mit den beschriebenen Methoden lassen sich einzelne Gene von *Saccharomyces cerevisiae*, deren DNA-Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, untersuchen. Die komplette DNA-Sequenz des *S. cerevisiae* Genoms wurde am 24. April 1996 über das World Wide Wep (WWW) veröffentlicht.

Folgende Möglichkeiten bestehen, um auf DNA-Sequenzen des *S. cerevisiae* Genoms übers WWW zuzugreifen.

MIPS (Munich Information Centre of Protein Sequence)

Adresse <http://speedy.mips.biochem.mpg.de/mips/yeast/yeast-genom.htmlx>

SGD (Saccharomyces Genome Database, Stanford)

Adresse <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>

YPD (Yeast Protein Database, Cold Spring Harbor)

Adresse: <http://www.prteome.com/YPDhome.html>

Die vollständige DNA-Sequenz des *S. Cerevisiae* Genoms ist auch über FTP (file transfer protocol) in Europa (z.B. unter der Adresse: [ftp.mips.embnet.org](ftp://mips.embnet.org)) in den USA (Adresse: [genome-ftp.stanford.edu](ftp://genome-ftp.stanford.edu)) oder in Japan (Adresse: [ftp.nig.ac.jp](ftp://nig.ac.jp)) zugänglich.

Unter Verwendung der beschriebenen Methoden kann mit Hilfe dieser Sequenzinformation für jedes einzelne *Saccharomyces cerevisiae* Gen bestimmt werden, ob das jeweilige Gen für *S. cerevisiae* essentiell ist.

Im Genom von *S. cerevisiae* wurden auf diese Weise die Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w als essentiell identifiziert.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über diese essentiellen Gene und die damit in Zusammenhang stehenden Informationen. In Spalte 1 sind die Bezeichnungen für die erzeugten Mutantenstamm (CEN.PK2 Stämme, in denen das essentielle Gen durch ein Markergen ausgetauscht wurde), in Spalte 2 die systematischen Gen-Namen der essentiellen Gene (Bezeichnung unter der die entsprechenden DNA-Sequenzen in Datenbanken geführt werden), in Spalte 3 die zur Herstellung des Mutantenstämme verwendeten Selektionsmarker sowie in den Spalten 4 und 5 die deletierten Nukleotide und die dazu korrespondierenden Aminosäuren der essentiellen Gene (als Bezugspunkt dient die Position 1; Position 1 ist das A des voraussichtlichen Start-Codons ATG des offenen Leserahmens) angegeben. Soweit verfügbar, sind auch die Gen-Namen (Spalte 6) und Einträge in Datenbanken DB (Spalte 7), angegeben. Insbesondere sind dort Eintragungen aus Datenbanken über die Essentialität der Gene vermerkt. Beispielsweise bei dem Gen YGR060w ist vermerkt, daß dieses Gen zuvor als nicht essentiell klassifiziert wurde. Unter Verwendung des CEN.PK2 Stammes wurde nun überraschenderweise gefunden, daß das YGR060w Gen doch essentiell ist. Darüber hinaus sind in Spalte 8, soweit vorhanden, weitere Informationen z.B. bzgl. der Funktion der als essentiell identifizierten Gene oder der kodierten Proteine und/oder Homologien/Ähnlichkeiten zu anderen Genen oder Proteinen angegeben.

Die Angaben in Tabelle 6 unterstreichen, daß obwohl die DNA-Sequenzen der *S. cerevisiae* Gene (Spalte 2) bekannt sind, über die Funktion, oder die charakteristischen Eigenschaften dieser Gene bzw. der kodierten Proteine bisher kaum etwas bekannt ist und auch die essentielle Funktion dieser Gene oder der durch diese Gene kodierten Proteine bisher nicht bekannt war.

Unter dem systematischen Gennamen (Spalte 2 in Tabelle 6) sind die Sequenzen der als essentiell identifizierten Gene in Gendatenbanken, z.B. den o.g. zugänglich. Die Erfindung betrifft die Verwendung der essentiellen Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w,

YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w.

Ausgehend von dem Stamm CEN.PK2 (Scientific Research & Technologie GmbH, Oberursel, Deutschland) wurden unter Verwendung einer der drei genannten Methoden die in Tabelle 6, Spalte 1 genannten *Saccharomyces cerevisiae* Stämme CEN.EN27, CEN.EN28, CEN.EN8, CEN.RO23, CEN.RO30, CEN.RO6, CEN.RO8, CEN.SR14, CEN.SR15, CEN.SR2, CEN.SR26, CEN.SR41, CEN.SR55, CEN.SR66, CEN.SR80, CEN.SR81, CEN.HE1, CEN.HE17, CEN.HE18, CEN.HE2, CEN.HE4, CEN.HE9, CEN.HI10, CEN.HI23, CEN.HI28, CEN.HI31, CEN.HI5, CEN.HI7, CEN.FE8, CEN.KR28, CEN.TS02, CEN.TS04 und CEN.ZI26 erzeugt. Diese Stämme sind dadurch definiert, daß die in Tabelle 6, Spalte 4 angegebenen Nukleotide (bzw. die in Spalte 5 angegebenen Aminosäuren) durch die in Tabelle 6, Spalte 3 angegebenen Selektionsmarker ersetzt wurden.

Die Erfindung betrifft die Stämme CEN.EN27, CEN.EN28, CEN.EN8, CEN.RO23, CEN.RO30, CEN.RO6, CEN.RO8, CEN.SR14, CEN.SR15, CEN.SR2, CEN.SR26, CEN.SR41, CEN.SR55, CEN.SR66, CEN.SR80, CEN.SR81, CEN.HE1, CEN.HE17, CEN.HE18, CEN.HE2, CEN.HE4, CEN.HE9, CEN.HI10, CEN.HI23, CEN.HI28, CEN.HI31, CEN.HI5, CEN.HI7, CEN.FE8, CEN.KR28, CEN.TS02, CEN.TS04 und CEN.ZI26 sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stämme und die Verwendung dieser Stämme.

Eine Ausführungsform des Verfahrens ist, daß die essentiellen Gene von *Saccharomyces cerevisiae*, insbesondere die Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w oder Teile derselben eingesetzt werden, um korrespondierende Gene, insbesondere sequenz- und/oder funktionsähnliche Gene, in anderen Myceten zu identifizieren.

Sequenzhomologe Gene können nach bekannten Verfahren z. B. mit Hilfe des Homologiescreenings (Sambrook, J. et al. (1989) Molecularcloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.) oder mit Hilfe der PCR-Technik unter Verwendung von spezifischen Primern aus genomischen Banken und/oder cDNA Banken der entsprechenden Myceten isoliert werden.

Funktionsähnliche Gene in anderen Mycetenspezies sind Gene, die in dem anderen Mycetenspezies eine ähnliche oder die gleiche Funktion innehaben wie die identifizierten essentiellen Gene in *S. cerevisiae*. Die funktionsähnlichen Gene können gegebenenfalls funktionshomolog zu den entsprechenden *S. cerevisiae* Genen sein. Funktionsähnliche Gene können gegebenenfalls sequenzhomolog zu den entsprechenden essentiellen *S. cerevisiae* Genen sein. Funktionsähnliche bzw. funktionshomologe Gene aus anderen Myceten kodieren vorzugsweise für Proteine, die in ihrer Funktion den entsprechenden *S. cerevisiae* Proteinen ähnlich sind (funktionsähnliche Proteine) bzw. die in ihrer Funktion zu den entsprechenden *S. cerevisiae* Proteinen homolog sind (funktionshomologe Proteine). Funktionsähnliche bzw. funktionshomologe Gene aus anderen Myceten bzw. die durch diese Gene kodierten Proteine können die Funktion des entsprechenden essentiellen *S. cerevisiae* Gens bzw. des durch dieses Gen kodierten Proteins ganz oder teilweise komplementieren.

Die Erfindung betrifft deshalb auch Verfahren mit denen Gene in anderen Myceten identifiziert werden können, die zu den essentiellen Genen in *S. cerevisiae* funktionsähnlich sind. Die Erfindung betrifft insbesondere Verfahren zur Identifizierung von funktionsähnlichen Genen in anderen Myceten, wobei die essentiellen Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt werden.

Vorzugsweise werden in diesen Verfahren zur Identifizierung von funktionsähnlichen Genen in anderen Myceten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen erzeugt, in denen ein essentielles Gen von *Saccharomyces cerevisiae* unter die Kontrolle eines regulierbaren Promotors gestellt wird. Die auf diese Weise veränderten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen werden dann vorzugsweise unter Wachstumsbedingungen angezogen, unter denen der regulierbare Promotor aktiv

ist und die veränderten *S. cerevisiae* Zellen mit cDNA, die aus der anderen Mycetenspezies hergestellt wurde und in einem Expressionsvektor vorliegt, transformiert, woraufhin der regulierbare Promotor, beispielsweise durch Veränderung der Kulturbedingungen, abgeschaltet wird, so daß auf diese Weise die *Saccharomyces cerevisiae* Zellen selektiert werden, in denen die cDNA, die für ein funktionsähnliches Protein aus der anderen Mycetenspezies kodiert, exprimiert wird.

Aus den selektierten *S. cerevisiae* Zellen kann dann gegebenenfalls die cDNA, die das zu dem essentiellen Gen von *Saccharomyces cerevisiae* funktionsähnliche Gen aus der anderen Mycetenspezies repräsentiert, isoliert und analysiert wird. Auf diese Weise ist direkt die kodierende Sequenz eines funktionsähnlichen Gens aus einer anderen Mycetenspezies zugänglich. Mit Hilfe der cDNA kann nach bekannten Verfahren, z.B. mit Hilfe des Homologiescreenings einer genomischen Bank hergestellt aus der anderen Mycetenspezies, das funktionsähnliche Gen in der anderen Mycetenspezies identifiziert werden. Auf diese Weise sind dann auch die regulatorischen Sequenzen, z.B. Promotor und Enhancer des funktionsähnlichen Gens zugänglich.

In einem solchen Verfahren wird vorzugsweise eines der essentiellen Gen von *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt aus der Gruppe der Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w unter die Kontrolle eines regulierbaren Promotors gestellt.

Zur Auffindung von funktionsähnlichen Genen in anderen Myceten kann beispielsweise aus einer zu untersuchenden Mycetenspezies mRNA nach bekannten Verfahren isoliert (Sambrock et al., 1989) und nach ebenfalls bekannten Verfahren aus der mRNA cDNA hergestellt (Sambrock et al., 1989; oder cDNA Synthese Kits, z. B. Firma Stratagene) werden.

Die hergestellte cDNA kann gerichtet in einen geeigneten Expressionsvektor integriert werden.

Beispielsweise kann die Synthese des ersten cDNA Strangs in Gegenwart von Primern durchgeführt werden, die geeignete Restriktionsschnittstellen aufweisen, um eine spätere Klonierung in der richtigen Orientierung vor den jeweiligen Promotor des Expressionsvektors ermöglichen. Als Restriktionsschnittstellen können alle bekannten Restriktionsschnittstellen verwendet werden. Als Primer kann beispielsweise der nachfolgend beschriebene ca. 50 Nukleotide lange Primer verwendet werden.

SEQ ID NO. 1: 5' - GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTXXXXXTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'

Die Sequenz (X)₆ steht für eine geeignete Restriktionsschnittstelle, beispielsweise für XhoI.

Nach der Zweitstrang-Synthese können die kohäsiven Enden der doppelsträngigen cDNA aufgefüllt (blunt end) und die Enden der cDNA dann mit geeigneten DNA-Adaptersequenzen ligiert werden. Die DNA-Adaptersequenzen sollten eine Restriktionsschnittstelle beinhalten, die verschieden von der Restriktionsschnittstelle sein sollte, die in dem Primer für die Synthese des ersten cDNA-Stranges verwendet wurde. Die DNA-Adapter können beispielsweise aus 9- und 13-mer Oligonukleotiden, die zueinander komplementär sind und an ihrem Ende das kohäsive Ende einer Restriktionsschnittstelle darstellen, bestehen. Beispielsweise können diese Enden eine EcoRI-Schnittstelle sein:

SEQ ID NO. 2: 5' XXXXXGGCAGAG 3'
3' XCCGTGCTC 5'

Die X in der dargestellten Adaptersequenz stellen das kohäsive Ende einer Restriktionsschnittstelle dar.

Die mit entsprechenden Adaptersequenzen versehene cDNA wird anschließend mit der Restriktionsendonuklease, deren Erkennungsstelle im Primer für die Synthese des ersten cDNA Strangs verwendet wurde, geschnitten, beispielsweise mit XhoI. Die erhaltene cDNA hätte in diesem Beispiel somit an ihrem 3'-Ende ein XhoI und am 5'-Ende ein EcoRI überstehendes Ende und könnte somit gerichtet in einen mit der Restriktionsenzymen XhoI und Eco RI geschnittenen Expressionsvektor integriert werden.

Als Expressionsvektoren eignen sich unter anderem *E. coli*/*S. cerevisiae* Pendel-Vektoren d. h. Vektoren, die sowohl für *E. coli* als auch für *S. cerevisiae* verwendet werden können. Solche Vektoren können dann z. B. in *E. coli* vermehrt werden. Als Expressionsvektoren können sowohl solche Vektoren, die in hoher als auch solche, die in niedriger Kopien-Zahl in *S. cerevisiae* Zellen vorliegen, verwendet werden. Hierfür eignen sich beispielsweise Vektoren aus der Serie pRS423 - pRS426 (pRS423, pRS424, pRS425, pRS426) bzw. pRS313 -pRS316 (pRS313, pRS314, pRS315, pRS316) (Sikorski, R.S. und Hieter P., (1989) Genetics 122: 19 - 27; Christianson, T. W. et al., (1992) Gene 110: 119 - 122).

Die Expressionsvektoren sollten geeignete *S. cerevisiae* Promotoren und Terminatoren aufweisen. Haben die verwendeten Expressionsvektoren diese nicht, so werden entsprechende Promotoren und Terminatoren so inseriert, daß ein nachfolgender Einbau der erzeugten cDNA möglich bleibt. Insbesondere eignen sich die Promotoren der *S. cerevisiae* Gene MET25, PGK1, TPI1, TDH3, ADHI, URA3. Es können sowohl Promotoren der Wildtyp-Gene in unveränderter Form als auch Promotoren, die in der Art verändert wurden, daß bestimmte Aktivatorsequenzen und/oder Repressorsequenzen entfernt wurden, verwendet werden. Als Terminatoren eignen sich beispielsweise die Terminatoren der *S. cerevisiae* Gene MET25, PGK1, TPI1, TDH3, ADHI, URA3.

In Verfahren zur Auffindung von funktionsähnlichen Genen in anderen Mycetenspezies, wird ein essentielles Gen von *S. cerevisiae* ausgewählt und dieses Gen entweder integrativ (1) oder extrachomosom (2) unter die Kontrolle eines regulierbaren Promotors gestellt.

1. Für die Integration eines regulierbaren Promotors in das *S. cerevisiae* Genom, wird dieser gegen den nativen Promoter des ausgewählten essentiellen Gens ausgetauscht, beispielsweise mittels PCR-vermittelter homologer Rekombination (Güldener et al., 1996). Die PCR-vermittelte homologe Rekombination kann beispielsweise in dem diploiden *S. cerevisiae* Stamm CEN.PK2 durchgeführt werden. Die genetische Aufspaltung kann durch Tetraden-Analyse überprüft werden.

Bei der Tetraden-Analyse werden vier lebensfähige Ascosporen erhalten, wobei das ausgewählte essentielle Gen bei zwei haploiden Segreganten unter der Kontrolle des nativen Promotors steht, während das essentielle Gen bei den beiden anderen Segreganten unter der Kontrolle des regulierbaren Promotors steht. Die letztgenannten haploiden Segreganten werden für die Transformation mit der in dem Expressionsvektor vorliegenden cDNA eingesetzt.

2. Bei der extrachromosomalen Variante wird zunächst das ausgewählte essentielle Gen von *S. cerevisiae* mit der in dem Expressionsvektor vorliegenden cDNA hinter einen regulierbaren *S. cerevisiae* Promotor in einen geeigneten Expressionsvektor inseriert, beispielsweise einen *E. coli*/*S. cerevisiae* Pendel-Vektor. Beispielsweise kann dazu das essentielle Gen mittels PCR an genomischer DNA von *S. cerevisiae* vom ATG Start -Codon bis einschließlich der Terminationssequenz amplifiziert werden. Die dazu eingesetzten Primer können so konstruiert werden, daß sie Erkennungsstellen für geeignete Restriktionsenzyme enthalten, die eine nachfolgende Insertion hinter den regulierbaren Promotor eines Expressionsvektors erleichtern.

Der rekombinante Expressionsvektor mit einer plasmidkodierten Kopie des ausgewählten essentiellen *S. cerevisiae* Gens unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors dient nachfolgend zur Transkomplementation des entsprechenden Mutanten-Allels. Das entsprechende Mutanten-Allel kann aus den in Tabelle 6 aufgeführten, durch homologe Rekombination hergestellten heterozygot-diploiden Mutanten-Stämmen (1. Spalte in Tabelle 6) ausgewählt werden.

Der Expressionsvektor mit dem ausgewählten essentiellen *S. cerevisiae* Gen wird in den entsprechenden heterozygot-diploiden Mutanten-Stamm, der anstelle des ausgewählten essentiellen *S. cerevisiae* Gens das Gen eines Selektionsmarkers trägt, transformiert. Die Transformanten werden durch Selektion auf den im verwendeten Expressionsvektor enthaltenen Auxotrophie- bzw. Nukleobasen-Marker isoliert. Die erhaltenen transformierten heterozygot-diploiden Mutanten-Stämme werden einer Tetraden-Analyse unterzogen. Dabei werden vier lebensfähige Segreganten erhalten. Durch Rückverfolgung der entsprechenden Marker des Mutanten-Allels und des Expressionsvektors lassen sich transformierte Wildtyp-Segreganten von Segreganten, bei denen die genomische Kopie des essentiellen Gens entfernt wurde, unterscheiden. Segreganten, bei denen die genomische Kopie des ausgewählten essentiellen Gens entfernt wurde, werden als trans-komplementierte haploide Mutanten-Stämme bezeichnet. Sie werden für die Transformation mit der in dem Expressionsvektor vorliegenden cDNA der zu untersuchenden Mycetenspezies eingesetzt.

Insbesondere werden heterozygot-diploide *Saccharomyces cerevisiae* Zellen, bei denen eines der essentiellen Gene durch ein Markergen ersetzt ist, mit einem rekombinanten Expressionsvektor, der den kodierenden Teil des essentiellen *Saccharomyces cerevisiae* Gens unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors enthält, transformiert. Beispielsweise wird in den heterozygot-diploiden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ein essentielles Gen durch ein Gen, das für einen Auxotrophiemarker kodiert oder durch ein Resistenzgen ersetzt.

In dem Verfahren werden vorzugsweise *Saccharomyces cerevisiae* Zellen des Stammes CEN.PK2 verwendet. Es werden darüberhinaus mit diesem Stamm vorzugsweise *Saccharomyces cerevisiae* Zellen erzeugt werden, in deren Genom der native Promotor des essentiellen Gens durch einen regulierbaren Promotor ersetzt wird oder solche Zellen, bei denen der native Promoter des essentiellen Gens extrachromosomal durch einen regulierbaren Promotor ersetzt wird.

Die Erfindung betrifft die Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen der Stämme CEN.EN27, CEN.EN28, CEN.EN8, CEN.RO23, CEN.RO30, CEN.RO6,

CEN.RO8, CEN.SR14, CEN.SR15, CEN.SR2, CEN.SR26, CEN.SR41, CEN.SR55, CEN.SR66, CEN.SR80, CEN.SR81, CEN.HE1, CEN.HE17, CEN.HE18, CEN.HE2, CEN.HE4, CEN.HE9, CEN.HI10, CEN.HI23, CEN.HI28, CEN.HI31, CEN.HI5, CEN.HI7, CEN.FE8, CEN.KR28, CEN.TS02, CEN.TS04 und CEN.ZI26 in einem Verfahren zur Identifizierung von funktionsähnlichen Genen und/oder funktionsähnlichen Proteinen in anderen Myceten, insbesondere zur Identifizierung von funktionsähnlichen Genen in *Candida albicans* und *Aspargillus fumigatus*. Darüber hinaus betrifft die Erfindung die Verwendung dieser *Saccharomyces cerevisiae* Zellen zur Identifizierung von funktionsähnlichen menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Genen bzw. der durch diese Gene kodierten Proteine (bzw. zur Überprüfung, ob funktionsähnliche menschliche, tierische oder pflanzliche Gene bzw. der durch solche Gene kodierten Proteine überhaupt existieren).

Als regulierbare Promotoren können aktivierbare und/oder nicht aktivierbare bzw. reprimierbare Promotoren eingesetzt werden. Diese Promotoren können aus natürlich und/oder künstlich angeordneten Promotorsequenzen bestehen.

Als regulierbare Promotoren können beispielsweise die Promotoren der Gene GAL1 und entsprechende Promotor-Derivate, beispielsweise solche, bei denen verschiedene UAS (upstream activatory sequence)-Elemente entfernt wurden (GALS, GALL; Mumberg, J. et al., (1994) *Nucleic Acids Research* 22: 5767 - 5768) verwendet werden. Als regulierbare Promotoren können auch die Promotoren gluconeogenetischer Gene, wie z.B. FBP1, PCK1, ICL1 oder Teile davon, beispielsweise deren Aktivator- (UAS1 bzw. UAS2) oder Repressor- (URS, upstream repression sequence) Sequenzen eingesetzt werden (Niederacher et al. (1992) *Curr. Genet.* 22: 363 - 370; Proft et al. (1995) *Mol. Gen. Genet.* 246: 367 - 373; Schüller et al., (1992) *EMBO J.* 11: 107 - 114; Guarente et al., (1984) *Cell* 36: 503 - 511).

Das Verfahren beinhaltet, daß ein auf diese Weise veränderter *S. cerevisiae* Mutanten-Stamm (d.h. mit regulierbarem Promotor) unter Wachstumsbedingungen angezogen wird, unter denen der regulierbare Promotor aktiv ist, so daß das essentielle *S. cervisiae* Gen exprimiert wird. Die *S. cerevisiae* Zellen werden dann

mit einer repräsentativen Menge des rekombinanten Expressionsvektors, der die cDNA der zu untersuchenden Mycetenspezies enthält, transformiert. Die Transformanten exprimieren dann zusätzlich das Protein, dessen cDNA in dem rekombinanten Expressionsvektor vorliegt.

Das Verfahren beinhaltet, daß die Wachstumsbedingungen in der Weise verändert werden, daß der regulierbare Promotor unter dessen Kontrolle das ausgewählte essentielle Gen von *S. cerevisiae* exprimiert wird, abgeschaltet wird. Beispielsweise können die Wachstumsbedingungen durch einen Wechsel des Mediums verändert werden. Wenn beispielsweise der GAL1 Promotor oder ein Derivat dieses Promotors verwendet wird, kann von einem Medium mit Galaktose (induzierter Zustand) zu Glukose haltigem Medium (reprimierter Zustand) gewechselt werden.

Diese veränderten Bedingungen sind für die *S. cerevisiae* Zellen, in denen der rekombinante Expressionsvektor nicht die cDNA des funktionsähnlichen Gens der anderen Mycetenspezies trägt (d.h. in denen die Funktion des essentiellen Gens nicht durch ein funktionsähnliches Gen komplementiert werden kann), letal. Dagegen können *S. cerevisiae* Zellen überleben, in denen ein funktionsähnliches Gen der anderen Mycetenspezies exprimiert wird, da diese Zellen den letalen Stoffwechseldefekt mit dem durch das funktionsähnliche Gen kodierten Protein komplementieren können.

Das Verfahren beinhaltet, daß aus den überlebenden Transformanten der Expressionsvektor (das Plasmid) nach bekannten Verfahren isoliert wird (Strathern, J. N. und Higgins, D. R. (1991) Recovery of Plasmids from Yeast into *Escherichia coli*: Shuttle Vectors in: Guthrie, C. und Fink, G. R. Methods in Enzymology. Volume 194. Guide to yeast genetics and molecular biology. Academic Press, San Diego, 319 - 329) und die cDNA mit Methoden der DNA-Analyse, beispielsweise mit Hilfe der DNA Sequenzierung, analysiert wird (Sanger et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 - 5467).

Das Verfahren beinhaltet, daß essentielle Gene aus *S. cerevisiae* eingesetzt werden, um funktionsähnliche und/oder sequenzhomologe Gene in anderen

Myceten, insbesondere Gene funktionsähnlicher und/oder sequenzhomologer human-, tier und pflanzenpathogener Myceten zu identifizieren. Beispielsweise können dafür Myceten der Klassen Phycomyceten oder Eumyceten, besonders der Unterklassen Basidiomyceten, Ascomyceten, insbesondere Hemiascomycetales (Hefen) und Plectascales (Schimmelpilze) und Gymnascales (Haut- und Haarpilze) oder der Klasse Hyphomyceten, insbesondere der Unterklassen Conidiosporales (Hautpilze) und Thallosporales (Sproßpilze), wobei insbesondere die Gattungen *Mucor*, *Rhizopus*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides* (*brasiliensis*) (*Blasomyces brasiliensis*), *Endomyces* (*Blastomyces*), *Aspergillus*, *Penicillium* (*Scopulariopsis*), *Trichophyton* (*Ctenomyces*), *Epidermophyton*, *Microsporon*, *Piedraia*, *Hormodendron*, *Phialophora*, *Sporotrichon*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Geotrichum* und *Trichosporon* verwendet werden.

Besonders hervorzuheben ist die Verwendung von *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blasomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* und *Sporothrix schenckii*.

Das Verfahren beinhaltet, daß essentielle Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* und funktionsähnliche Gene aus anderen Myceten eingesetzt werden, um Substanzen zu identifizieren, die die funktionelle Expression dieser essentiellen Gene aus *S. cerevisiae* bzw. der funktionsähnlichen Gene und/oder die funktionelle Aktivität der kodierten Proteine ganz oder teilweise inhibieren können. Vorzugsweise sind die funktionsähnlichen Genen bzw. die durch diese Gene kodierten Proteine in den anderen Myceten ebenfalls essentiell. Mit Hilfe dieses Verfahrens können Substanzen identifiziert werden, die das Wachstum von Myceten inhibieren und die als Antimykotika, beispielsweise zur Herstellung von Arzneimitteln, eingesetzt werden können.

Ein besonderes Merkmal des Verfahrens ist, daß für das Screening der Substanzen essentielle Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* bzw. funktionsähnliche Gene aus anderen Myceten, insbesondere solche, die für die andere Mycetenspezies essentiell sind, als Targets eingesetzt werden. Das Verfahren beinhaltet, daß als Targets sowohl die essentiellen Gene aus *S. cerevisiae*, als auch funktionsähnliche

und/oder sequenzhomologe der essentiellen *S. cerevisiae* Gene aus anderen Myceten verwendet werden können.

Eine Ausführungsform des Verfahrens ist, daß Zellen, insbesondere Mycetenzellen, die ein essentielles Gen, das als Target eingesetzt wird überexprimieren, bereitgestellt werden und daß diese Zellen mit einer zu testenden Substanz inkubiert werden. Auf diese Weise kann die wachstumsinhibierende Wirkung dieser Substanz im Bezug auf das essentielle Target-Gen bestimmt werden. Ein einzelnes Gen, welches in diesem Verfahren untersucht wird, wird auch als Target-Gen bzw. zu untersuchendes Gen bezeichnet. Ein Target Gen kann ein essentielles *S. cerevisiae* Gen, insbesondere eines der Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w oder YLL003w sein oder ein funktionsähnliches Gen aus einer anderen Mycetenspezies sein.

In dem Verfahren wird der wachstumsinhibierende Effekt einer Substanz auf eine Zelle, in der ein Target-Gen überexprimiert wird, bestimmt. Dabei kann die Substanz entweder die Expression des essentiellen Gens oder des funktionsähnlichen Gens und/oder die funktionelle Aktivität des kodierten Proteins inhibieren.

Eine weitere Ausführungsform ist, daß Zellen, insbesondere Mycetenzellen, die ein Target-Gen in unterschiedlichem Maße exprimieren, bereitgestellt werden und daß diese Zellen dann mit einer zu testenden Substanz inkubiert werden und die wachstumsinhibierende Wirkung dieser Substanz auf die Zellen vergleichend bestimmt wird.

Das Verfahren beinhaltet, daß zwei oder mehrere Zellen, insbesondere Mycetenzellen, beziehungsweise davon abgeleitete Stämme, die sich dadurch unterscheiden, daß sie das Target-Gen in unterschiedlichem Maße exprimieren, verwendet werden. Beispielsweise können zwei, drei, vier, fünf, zehn oder mehr Zellen bzw. die dazu korrespondierenden Stämme im Bezug auf die

wachstumsinhibierende Wirkung einer Substanz, die in einer definierten Konzentration eingesetzt wird, vergleichend analysiert werden. Durch solche Konzentrationsreihen können beispielsweise antimykotisch wirkende Substanzen von cytotoxischen oder nicht wirksamen Substanzen unterschieden werden.

Eine besondere Ausführungsform des Verfahrens ist, daß haploide Mycetenzellen/Stämme für das Screening eingesetzt werden, insbesondere können haploide *S. cerevisiae* Zellen/Stämme dafür verwendet werden.

Das Verfahren beinhaltet, daß das als Target ausgewählte essentielle Gen in einen geeigneten Expressionsvektor integriert wird.

Als Expressionsvektoren eignen sich beispielsweise *E. coli*/*S. cerevisiae* Pendel-Vektoren. Insbesondere können Vektoren eingesetzt werden, die sich in ihrer Kopienzahl pro Zelle unterscheiden. Beispielsweise können einerseits Vektoren verwendet werden, die in hoher Kopien-Zahl in transformierten *S. cerevisiae* Zellen vorliegen als auch solche Vektoren, die in niedriger Kopienzahl vorliegen. Eine Ausführungsform ist, daß Expressionsvektoren eingesetzt werden, die eine Integration des Target-Gens ins *S. cerevisiae* Genom erlauben.

Als Expressionsvektoren eignen sich beispielsweise die Vektoren pRS423, pRS424, pRS425, pRS426, pRS313, pRS314, pRS315, pRS316, pRS303, pRS304, pRS305, pRS306 (Sikorski und Hieter, 1989; Christianson, et al., 1992).

Die Vektoren der Serie pRS423-pRS426 liegen in hoher Kopienzahl (etwa 50 - 100 Kopien/Zelle) vor. Im Gegensatz dazu liegen die Vektoren der Serie pRS313-pRS316 in niedriger Kopienzahl (1 - 2 Kopien/Zellen) vor. Werden Expressionsvektoren aus diesen beiden Serien verwendet, dann liegt das Target-Gen als extrachromosomale Kopie vor. Mit Hilfe der Vektoren der Serie pRS303-pRS306 können die Target-Gene ins Genom integriert werden. Durch die Verwendung dieser drei verschiedenen Expressionsvektor-Typen, die sich nur bezüglich ihrer in *S. cerevisiae* Zellen vorliegenden Kopienzahl unterscheiden, ist

eine differenzierte bzw. abgestufte Expression des essentiellen *S. cerevisiae* Gens bzw. des funktionsähnlichen Gens möglich.

Das Verfahren beinhaltet, daß vergleichend die wachstumsinhibierende Wirkung von Substanzen im Bezug auf Zellen (z.B. Mycetenzellen)/Stämme, die mit unterschiedlichen Expressionsvektoren, die sich z. B. in der Kopienzahl des Vektors/Zelle unterscheiden, bestimmt wird. Solche Zellen können das essentielle Target-Gen in unterschiedlichem Maße exprimieren und eine abgestufte Reaktion auf die Substanz zeigen.

Das Verfahren beinhaltet auch, daß eine unterschiedlich starke Expression des Target-Gens in verschiedenen Zellen, insbesondere Mycetenzellen (geregelter Überexpression) dadurch erreicht wird, daß das Target-Gen in Expressionsvektoren zwischen speziell ausgewählte Promotoren und Terminatoren, beispielsweise *S. cerevisiae* Promotoren und Terminatoren inseriert wird. Beispielsweise eignen sich dafür Promotoren der *S. cerevisiae* Gene die konstitutiv, aber unterschiedlich stark exprimiert werden. Beispiele für solche Promotoren sind die nativen Promotoren der *S. cerevisiae* Gene MET25, PGK1, TPI1, TDH3, ADHI, URA3, TRP1, sowie entsprechende Derivate dieser Promotoren, beispielsweise Promotor-Derivate, die bestimmte Aktivatorsequenzen und/oder Repressorsequenzen nicht enthalten.

Für die geregelte Überexpression des Target-Gens eignen sich auch regulierbare Promotoren. Beispielsweise können die nativen Promotoren der Gene GAL1 bzw. entsprechende Derivate der Promotoren, z. B. solche, bei denen verschiedene UAS-Elemente entfernt wurden (GALS, GALL; Mumberg et al., (1994) *Nucleic Acids Research* 22: 5767 - 5768) sowie Promotoren gluconeogenetischer Gene, z. B. die Promotoren FBP1, PCK1, ICL1 oder Teile dieser Promotoren, z. B. deren Aktivator- (UAS1 bzw. UAS2) oder Repressor- (URS) Sequenzen in entsprechenden nicht aktivierbaren bzw. reprimierbaren Test-Promotoren (Schüller et al., (1992) *EMBO J.* 11: 107 - 114) Guarente et al., (1984) *Cell* 36: 503 - 511; Niederacher et al. (1992) *Curr. Genet.* 22: 363 - 370; Proft et al. (1995) *Mol. Gen. Genet.* 246: 367 - 373;) eingesetzt werden.

In den Expressionsvektoren können als Terminatoren beispielsweise die Terminatorsequenzen der *S. cerevisiae* Gene MET25, PGK1, TPI1, TDH3, ADHI, URA3 verwendet werden.

Das Verfahren beinhaltet, daß durch die Verwendung, geschickt ausgewählter Expressionsvektor-Typen und/oder die Herstellung von geeigneten Expressionsvektoren, gegebenenfalls unter Benutzung verschiedenen starker Promotoren und/oder unterschiedlich regulierter Promotoren, eine Reihe von Expressionsvektoren hergestellt werden können, die alle das gleiche Target-Gen enthalten, sich aber dadurch unterscheiden, daß sie das Target-Gen in unterschiedlichem Maße (unterschiedlich stark) exprimieren. Mit Hilfe solcher Reihen von Expressionsvektoren ist es möglich, eine in ihrer Stärke fein abgestufte Expression des Target-Gens zu erzielen. Mit Hilfe solcher Reihen von Expressionsvektoren ist es möglich, Mycetenzellen/Mycetenstämme herzustellen, die das Target-Gen in unterschiedlichem Maße exprimieren.

Das Verfahren beinhaltet, daß die Expressionsvektoren in haploide Wildtyp-Zellen von *S. cerevisiae* transformiert werden. Die so erhaltenen Zellen/Stämme werden in Flüssigmedium angezogen, mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz inkubiert und die Wirkung dieser Substanz auf das Wachstumsverhalten der Zellen/Stämme vergleichend analysiert, die das Target-Gen in unterschiedlichem Maße exprimieren. Das Verfahren beinhaltet auch, daß als Referenz haploide *S. cerevisiae* Zellen/Stämme, die mit dem jeweiligen Expressionsvektor-Typ ohne Target-Gen transformiert wurden, verwendet werden.

Das Verfahren beinhaltet, daß bei der Verwendung von regulierbaren Promotoren, insbesondere beim Einsatz des GAL1 Promotors und dessen Derivaten (GALS und GALL) das Screening von Substanzen in verschiedenen Medien durchgeführt werden kann, da hier die Expressionsstärke durch die Wahl des jeweiligen Mediums stark zu beeinflussen ist. So nimmt die Expressionsstärke des GAL1 Promotors in folgender Weise ab: 2 % Galaktose > 1 % Galaktose + 1 % Glukose > 2 % Glycerin > 2 % Glukose.

Die wachstumsinhibierende Wirkung von Substanzen, die Wildtyp-Zellen von *S. cerevisiae* in ihrem Wachstum inhibieren, kann durch die Überexpression des essentiellen *S. cerevisiae* Gens bzw. des funktionsähnlichen Gens aus einer anderen Mycetenspezies ganz oder teilweise aufgehoben werden.

Das Verfahren beinhaltet auch, daß funktionsähnliche und/oder sequenzhomologe der essentiellen *S. cerevisiae* Gene beim Menschen, bei Tieren oder Pflanzen identifiziert werden. Die entsprechenden menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Gene könnten ebenfalls als Target-Gene in dem Verfahren eingesetzt werden, um zu überprüfen, ob antimykotisch wirkende Substanzen auf diese Target-Gene auch eine Wirkung haben. Dies ist ein besonderer Vorteil des Verfahrens, denn auf diese Weise können Substanzen identifiziert werden, die spezifisch das Wachstum von Myceten (bzw. von bestimmten Mycetenspezies) inhibieren. Spezifische antimykotisch wirksame Substanzen sollten auf entsprechende funktionsähnliche und/oder sequenzhomologe menschliche, tierische oder pflanzliche Gen bzw. die durch diese Gene kodierten Protein entweder einen vergleichsweise geringeren bzw. keinen Effekt haben.

Das Verfahren beinhaltet auch die Möglichkeit zu überprüfen, ob überhaupt funktionsähnliche und/oder sequenzhomologe menschliche, tierische oder pflanzliche Gene zu den entsprechenden essentiellen Mycetengenen existieren. Beispielsweise dadurch, daß die Homologie der identifizierten essentiellen Mycetengene oder von Teilen dieser Gene mit den in Datenbanken verfügbaren menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Sequenzen/Genen überprüft wird. Dadurch können aus den identifizierten essentiellen Mycetengenen bereits im Vorfeld, je nach Aufgabenstellung, diejenigen Gene ausgewählt werden, zu denen es z. B. beim Menschen keine sequenzhomologen und/oder funktionsähnlichen Gene gibt.

Dadurch bietet das Verfahren eine Vielzahl von Möglichkeiten gezielt antimykotisch wirkende Substanzen zu identifizieren, die dann z. B. den menschlichen Organismus nicht schädigen. Beispielsweise können Substanzen identifiziert werden, die zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Mykosen oder zur Prophylaxe bei einer Schwächung des Immunsystems verwendet werden

können. Beispielsweise können diese Substanzen z.B. zur Herstellung von Medikamenten, die zur Behandlung von mykotischen Infektionen, die z.B. im Verlauf der HIV-Infektion bzw. Aids oder Krankheiten wie Diabetis auftreten, eingesetzt werden. Mit Hilfe des Verfahrens können auch Substanzen identifiziert werden, die zur Herstellung von Fungiziden verwendet werden können. Insbesondere zur Herstellung von Fungiziden, die für Mensch und Tier unschädlich sind. Mit Hilfe des Verfahrens können auch spezifische antimykotisch wirksame Substanzen identifiziert werden, die zur Konservierung, z.B. von Lebensmitteln und Körperpflegemitteln verwendet werden können.

Weiterhin bietet das Verfahren auch die Möglichkeit antimykotisch wirksame Substanzen zu identifizieren, die ganz gezielt nur das Wachstum bestimmter Spezies von Myceten inhibieren, da im ersten Schritt mit Hilfe dieses Verfahrens überprüft werden kann, ob in einer anderen Mycetenspezies funktionsähnliche Gene überhaupt existieren. Andererseits können mit Hilfe dieses Verfahrens auch Substanzen identifiziert werden, die gegen eine Vielzahl von Mycetenspezies gleichzeitig wirksam sind ("Breitband-Antimykotika"), da mit Hilfe des Verfahrens in einem ersten Schritt festgestellt werden kann, ob zu einem essentiellen Gen in *S. cerevisiae* funktionsähnliche Gene in möglichst vielen anderen Mycetenspezies (z.B. humanpathogenen Mycetenspezies) existieren.

Ein besonderer Vorteil des Screeningverfahrens ist, daß es ausreicht zu wissen, daß die verwendeten Gene essentiell sind; über die Funktion der essentiellen Gene oder die Funktion der kodierten Proteine sind keine weiteren Informationen notwendig. Das ist insbesondere für die Identifikation von funktionsähnlichen Genen in anderen Mycetenspezies mit Hilfe der essentiellen Gene von *S. cerevisiae* vorteilhaft, da von vielen dieser Gene die DNA-Sequenzen nicht verfügbar sind.

Besondere Vorteile des Verfahrens sind:

- Es ist keinerlei Kenntnis über die biochemische Funktion der essentiellen Gene aus *S. cerevisiae* notwendig. Es können alle Genen im Bezug auf ihre Essentialität untersucht werden, deren Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist.
- Mit Hilfe der essentiellen Genen aus *S. cerevisiae* können funktionsähnliche

Gene aus anderen Mycetenspezies identifiziert werden, wobei wiederum nichts über deren biochemische Funktion bekannt sein muß.

- Darüber hinaus muß auch die Sequenz potentieller funktionsähnlicher Gene aus anderen Mycetenspezies nicht bekannt sein. Es wird nur die Sequenz von identifizierten funktionsähnlichen cDNAs bzw. Genen aufgeklärt.
- In dem Verfahren zum Auffinden antimykotisch wirksamer Substanzen wird nicht differenziert, ob die Substanz die funktionelle Expression des essentiellen bzw. funktionsähnlichen Gens inhibiert oder ob sie die funktionelle Aktivität des kodierten Proteins inhibiert.
- Gleichzeitig kann der Effekt der Substanzen auf funktionsähnliche menschliche, tierische und pflanzlichen Gene bzw. die kodierten Proteine getestet werden bzw. es kann überprüft werden, ob funktionsähnliche bzw. sequenzhomologe Gene überhaupt existieren.
- Einzelne Substanzen können auf diese Weise effizient auf ihre spezifische Wirksamkeit getestet werden.

Beispiele:

Beispiel 1: Die "Klassische Methode" zur Erzeugung von Deletions-Kassetten dargestellt für den YJR141w (Tabelle 6).

Deletion des ORF YJR141w-Gens aus *S. cerevisiae* unter Verwendung des HIS3-Gens von *S. cerevisiae*:

- 1) Klonierung eines 1,7kB XbaI-Fragments (enthalten entweder aus genomische *S. cerevisiae* DNA bzw. aus einem entsprechenden Cosmid-Klon, der das YJR141w-Gen beinhaltet) in einem puC18 Vektor, der mit dem Restriktionsenzym XbaI linearisiert wurde.
- 2) Das aus 1.) erhaltene Plasmid wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym BstEII geschnitten und nach dem Auffüllen der überstehenden DNA-Enden mit Hilfe des Enzyms Klenow-Polymerase (Sambrook et al., 1989) das erhaltene lineare

DNA-Fragment mit dem Restriktionsenzym *Cl*I geschnitten. Dadurch wurde ein 3,52kB und ein 0,87kB (Kilobasenpaare) großes DNA-Fragment erhalten.

3) Das *HIS3*-Gen von *S. cerevisiae* wird als genomisches 1,6kB *Bam*HI-Fragment in den mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnittenen Vektor pBluescript IIKS+ (Stratagene) inseriert und auf diese Weise das Plasmid pMR240 hergestellt.

4) Das Plasmid pMR240 wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *Xho*I geschnitten und dann die überstehenden DNA-Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt. Das lineare DNA-Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *Cl*I geschnitten. Dadurch wurde ein 1,36kB DNA-Fragment, daß das *HIS3*-Gen von *S. cerevisiae* enthält, erhalten.

5) Das 3,52kB DNA-Fragment aus 2.) wurde mit dem aus 4.) erhaltenen 1,36kB DNA-Fragment ligiert und auf diese Weise das Plasmid pRO6 erzeugt. Im Plasmid pRO6 wurde ein 870Bp langer DNA-Abschnitt des kodierenden Bereichs von *YJR 141w* deletiert und gegen den Selektionsmarker *HIS3* ersetzt.

6) Das Plasmid pRO6 wurde mit der Restriktionsendonuklease *Pvu*II linearisiert und zur Transformation von *S. cerevisiae* eingesetzt.

Beispiel 2: Konstruktion von Plasmiden für die SFH-Methode.

1) Als Ausgangsvektor wurde der Vektor pBluescript®II KS+ (Stratagene; Sequenz verfügbar: Genbank® X52327) verwendet.

2) Der Vektor pBluescript®II KS+ wurde mit dem Restriktionsenzym *Not*I linearisiert und die überstehenden Enden durch anschließende Inkubation mit Mungbohnen 5'-3'Exonuklease entfernt. Durch Religation des verkürzten DNA-Fragments wurde der Vektor pKS+Δ*Not*I hergestellt (Vektor pBluescript®II KS ohne die *Not*I Restriktionsschnittstelle).

3) Das Plasmid pKS+ Δ NotI wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und BamHI geschnitten und das DNA-Oligonucleotid, welches aus dem Primer-Paar PK3/PK4 erzeugt wurde, in das geöffnerte Plasmid ligiert. Das auf diese Weise erzeugte Plasmid pKS+neu (SEQ ID NO. 17) enthält zwischen der PstI und BamHI Restriktionsschnittstelle die neuen Restriktionsschnittstellen NotI, StuI, SfiI und NcoI:

PstI-NotI-StuI-SfiI-NcoI-BamHI

SEQ ID NO. 3: 5'-GCGGCCGCAAGGCCTCCATGGCCG-3' PK3

SEQ ID NO. 4: 5'-GATCCGGCCATGGAGGCCTTGCGGCCGCTGCA-3' PK4

4) Das Plasmid pKS+neu (SEQ ID NO. 17) diente als Ausgangsvektor zur Herstellung der Plasmide pPK5/6 (SEQ ID NO. 18), pPK7/8 (SEQ ID NO. 19), pPK9/10 (SEQ ID NO. 20) und pPK13/14 (SEQ ID NO. 21). Die Gene für die entsprechenden Aminosäure-/Nukleobasen-Auxotrophie-Marker wurden mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer an den Wildtyp- bzw. modifizierten Wildtyp-Genen (Beispiel 4 und Beispiel 5) amplifiziert.

Beispiel 3: Konstruktion des Plasmids pPK5/6 (pKS+neu - HIS 3) (SEQ ID NO. 18):

Unter Verwendung der Primer PK5 und PK6 wurde mittels PCR an genomischer *S. cerevisiae* DNA das HIS3-Gen amplifiziert, anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI geschnitten und in das mit BamHI und NotI geschnittene Plasmid pKS+neu inseriert. Die unterstrichenen DNA-Abschnitte der Primer entsprechen den Abschnitten, die der jeweiligen homologen Sequenzen der *S. cerevisiae* Gene entsprechen.

..NotI..
 SEQ ID NO. 5: 5'-ATCTGCAGCGGCCGCGTTTTAAGAGCTTGGTGAGCGC-3' PK5
 PstI
SfiI.....

SEQ ID NO. 6: 5'-ATGGATCCGGCCATGGAGGCCTCGTTCAGAATGACACGTAT-3' PK6
BamHI

Beispiel 4: Konstruktion des Plasmids pK7/8 (pKS+neu - LEU2) (SEQ ID NO. 19):

Unter Verwendung der Primer PK7 und PK8 wurde mittels PCR an Ycplac111 Vektor-DNA (Gietz, R. D. und Sugino, A. (1988) Gene 74: 527 - 534) als Matrize (modifiziertes Wildtyp-Gen) das LEU2 Gen von *S. cerevisiae* amplifiziert, die amplifizierte DNA anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI geschnitten und in ein mit BamHI und NotI geschnittenes Plasmid pKS+neu inseriert.

.....SfiI.....
SEQ ID No. 7: 5'-ATGGATCCGGCCATGGAGGCCTGTGGGAATACTCAGGTATCG-3' PK7
BamHI

..NotI..
SEQ ID NO. 8: 5'-ATCTGCAGCGGCCGCTTCTACCCTATGAACATATTCCATT-3' PK8
PstI

Beispiel 5: Konstruktion des Plasmids pPK9/10 (pKS+neu - URA3) (SEQ ID NO. 20):

Unter Verwendung der Primer PK9 und PK10 wurde mittels PCR an Ycplac33 Vektor-DNA (Gietz, R. D. und Sugino, A. (1988) Gene 74: 527 - 534) als Matrize (modifiziertes Wildtyp-Gen) das URA3 Gen von *S. cerevisiae* amplifiziert, die amplifizierte DNA anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI geschnitten und in das mit BamHI und NotI geschnittene Plasmid pKS+neu inseriert.

..NotI..
SEQ ID NO. 9: 5'-ATCTGCAGCGGCCGCAAACATGAGAATTGGGTAATAACTG-3' PK9
PstI

SEQ ID NO. 10:

.....SfiI.....

5'-ATGGATCCGGCCATGGAGGCCCTTCAAGAATTAGCTTTTCAATTCATC-3' PK10

BamHI

Beispiel 6: Konstruktion des Plasmids pPK13/14 (pKS+neu - TRP1) (SEQ ID NO. 21):

Unter Verwendung der Primer PK13 und PK14 wurde mittels PCR an genomischer *S. cerevisiae* DNA das TRP1-Gen amplifiziert, die amplifizierte DNA anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI geschnitten und in das mit BamHI und PstI geschnittene Plasmid pKS+neu inseriert.

..NotI..

SEQ ID NO. 11: 5'-ATCTGCAGCGGCCGGCATTTAATAGAACAGCATCG-3'

PK13

PstI

.....SfiI.....

SEQ ID NO. 12: 5'-ATGGATCCGGCCATGGAGGCCCACACCGCATAGATCGGC-3'

PK14

BamHI

Beispiel 7: "Klassische Methode" unter Verwendung der PCR-Technik
("Modifizierte klassische Methode") dargestellt für den YGR046w.

1) Unter Verwendung der Primer XSL-2N2 und G385-1 (vergleiche Punkt 4.) wurde der 3'-Bereich des YGR046w an genomischer *S. cerevisiae* DNA als Matrize amplifiziert. Die amplifizierte DNA wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen ClaI und EcoRI geschnitten und das erhaltene 508Bp DNA-Fragment in das zuvor mit den Restriktionsenzymen ClaI und EcoRI geschnittene Plasmid pPK9/10 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit p119-58 bezeichnet.

2) Unter Verwendung der Primer G385-3 und X9R2 (vergleiche Punkt 4.) wurde der 5'-Bereich des YGR046w an genomischer *S. cerevisiae* DNA als Matrize

amplifiziert. Die amplifizierte DNA wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen BamHI und BglII geschnitten und das erhaltene 1336Bp Fragment in das Plasmid p119-58, das zuvor mit BamHI geschnitten worden war, inseriert. Das resultierende Plasmid wurde mit pEN27 bezeichnet.

3) Das Plasmid pEN27 wurde nach der Linearisierung mit den Restriktionsenzymen SacI und Asp7 18 zur Transformation von *S. cerevisiae* eingesetzt.

4) Verwendete Primer:

SEQ ID No. 13:

XSL-2N2 5'- AGG CAG ACT ACA ACT TAG G -3'

SEQ ID NO. 14:

G385-1 5'- CTG AAT TCG ATG AGG AGA AGC TAG T -3'

SEQ ID NO. 15:

X9R2 5'- CTT CAA ACG CTT GTT AAA TCT TG -3'

SEQ ID NO. 16:

G385-3 5'- CAG GAT CCG TAG ACC ATT TTC AGA A -3'

Beispiel 8:

S. cerevisiae Zellen vom Stamm CEN.PK2 wurden mit jeweils ca. 5 µg DNA einer linearen Deletionskassette nach bekannten Verfahren transformiert (Gietz et al., 1992; Güldener et al., 1996). Der Transformationsansatz wurde auf entsprechenden Selektivmedien ausplattiert.

Bei Verwendung einer Deletionskassette die das Kanamycinresistenzgen enthielt, wurde auf Vollmedium (YEPD) mit Genitacin (G418®) ausplattiert. Bei der Verwendung einer Deletionskassette die sogenannte Auxotrophie-Marker enthielt wurde auf synthetischen Minimalmedien (SCD), die die entsprechende Aminosäure

(Histidin, Leucin oder Tryptophan) bzw. Nukleobase (Uracil) nicht enthielten, ausplattiert. Auf diese Weise wurde auf die Transformanten selektioniert, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hatte, da nur diese Zellen unter den veränderten Bedingungen wachsen konnten.

Tabelle 6

Name des erzeugten Stammes	systematischer Gen-Name	Selektionsmarker	deletierte Nukleotide	deletierte Aminosäuren	Name des Gens	DB Eintrag	Bemerkungen
CEN.EN27	YGR046w	URA3	18-1143	9-381	~		
CEN.EN28	YGR048w	LEU2	73-1077	25-359	UFD1	YPD kein Eintrag	ubiquitin fusion degradation protein
CEN.EN8	YGR060w	HIS3	(-)231-836	(-)77-279	ERG25	viable, temperatursensitiv	C-4 sterol methy oxidase
CEN.RO23	YJL074c	HIS3	169-3114	56-1038	~		similarity to Emericella nidulans chromosome scaffold protein
CEN.RO30	YJR136c	loxP-KanMX-loxP	4-1236	2-421			
CEN.RO6	YJR141w	HIS3	27-891	10-297	/		
CEN.RO8	YBR167c	HIS3	110-330	37-110	/		
CEN.SR14	YPL252c	loxP-KanMX-loxP	4-516	2-172			similarity to adrenoxin and ferrodoxin
CEN.SR15	YPL242c	loxP-KanMX-loxP	91-4485	31-1495			
CEN.SR2	YOR119c	loxP-KanMX-loxP	4-1452	2-484	RIO1	YPD kein Eintrag	similarity to C. elegans ZK632.3 protein; function unknown
CEN.SR26	YPL235w	loxP-KanMX-loxP	4-1413	2-471			homology to hypothetical protein YDR190c
CEN.SR41	YOR110w	LEU2	61-1197	21-399			homology to hypothetical protein YNL108c
CEN.SR55	YNL182c	loxP-KanMX-loxP	4-1665	2-555			
CEN.SR66	YOR206w	loxP-KanMX-loxP	73-2130	25-710			homology to RAD4 (Frameshift)
CEN.SR80	YJL054w	loxP-KanMX-loxP	82-1352	28-450			

Name des erzeugten Stammes	systematischer Gen-Name	Selektionsmarker	deletierte Nukleotide	deletierte Aminosäuren	Name des Gens	DB Eintrag	Bemerkungen
CEN.SR81	YJL039c	loxP-KanMX-loxP	4-5049	2-1683			similarity to HSP70 family
CEN.HE1	YNL258c	TRP1					
CEN.HE17	YNL245c	loxP-KanMX-loxP					
CEN.HE18	YNL038w	loxP-KanMX-loxP			NRD1		probable membrane protein
CEN.HE2	YNL251c	loxP-KanMX-loxP					plays a role in sequence specific regulation of nuclear pre m-RNA abundance
CEN.HE4	YNL256w	loxP-KanMX-loxP					similarity to bacterial dihydropteroate synthase
CEN.HE9	YNL260c	loxP-KanMX-loxP					
CEN.H10	YIR012w	URA3					beta transducin repeats
CEN.H123	YLR086w	loxP-KanMX-loxP					similarity to S. pombe cut3 protein
CEN.H128	YLR076c	loxP-KanMX-loxP					
CEN.H131	YLR100w	loxP-KanMX-loxP					
CEN.H15	YIR010w	URA3					EF-hand calcium binding domain
CEN.H17	YIL003w	URA3					similarity to E. coli MRP protein; ATPase
CEN.FE8	YBR102c	URA3					hypothetical membrane protein
CEN.KR28	YOL010w	loxP-KanMX-loxP					homology to S. pombe SPAC12g12.06c protein
CEN.TS02	YKL013c	loxP-KanMX-loxP					strong similarity to unknown C. elegans protein
CEN.TS04	YKL018w	loxP-KanMX-loxP					
CEN.Z126	YLL003w	LEU2			"SF11"		protein of unknown function

Tabelle 7: Verwendete Primer für die PCR vermittelte Gendeletion:

SEQ ID NO. 22: YPL252c-S1	5' ATA GGC GCT TCT CGT ATC TAT ACT CAA CCC GCC CCC AAT GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC 3'
SEQ ID NO. 23: YPL252c-S2	5' AAA TTG GGG GCA CAA ATG AGG GGT AAA AAT GCA GAC ATT AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG 3'
SEQ ID NO. 24: YPL242c-S1	5' TCT AAA TCG TTA TGT TGA AAA CCT AGG CAC CAA TGT GAC TCA GCT GAA GCT TCG TAC GC 3'
SEQ ID NO. 25: YPL242c-S2	5' CAG CTT TTG CCC AAT ATG CTC AAA ACC GAG TTA TCT ATT AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG 3'
SEQ ID NO. 26: YPL235w-S1	5' CAA GTT ACT TTG AAA GGA AAT AAA AAA AAT TGT CAG CAT GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC 3'
SEQ ID NO. 27: YPL235w-S2	5' ATA TTT GAT GCA ATT TCT GCC TTA AAG TAC AAA ATG CTT AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG 3'
SEQ ID NO. 28: YNL182c-S1	5' AAT ATT CAT AAA ACA GGA TCT TTC AAG GGA CGA TAA AAT GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC 3'
SEQ ID NO. 29: YNL182c-S2	5' TTC CTA TTT TAT TGT ACA AAA TGC GCG ACT ATT CCG TTT AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG 3'
SEQ ID NO. 30: YOR206w-S1	5' TCA ATC GAA GCA TTT GAA GCA TAC TCT AGA CCA AAG AAG ACA GCT GAA GCT TCG TAC GC 3'
SEQ ID NO. 31: YOR206w-S2	5' TTG AAT TCA AGA CAA AAA ATC AAA TCT TGC TGA GTT GTT AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG 3'
SEQ ID NO. 32: YJL054w-S1	5' GAA GCC TGG CTA TAC CAA TCC GGC TTT AAA AGC CCT TGG TCA GCT GAA GCT TCG TAC GC 3'

SEQ ID NO. 33:
YJL054w-S2 5' CTT TAC CCT GTT TGA CCC AGT TCT GTG GCC AAT CTT
TTT CGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG 3'

SEQ ID NO. 34:
YJL039c-S1 5' TTC CTA AAA GTA ATT CTT AAA AGT GAT AAT GAA TGA
CTT ACA GCT GAA GCT TCG TAC GC 3'

SEQ ID NO. 35:
YJL039c-S2 5' ACC TAG TTG AAA AGA TTT GTT CCG CAG ATA AGA AAA
AAT GGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG 3'

SEQ ID NO. 36:
YOR119c-S1 5' CAC AGG GCC GCA TTA TTT CTT TGA TTT CGT TTT TTT
CAC CCA GCT GAA GCT TCG TAC GC 3'

SEQ ID NO. 37:
YOR119c-S2 5' GAT TTA GAG ATT CAA ACT CCG TTA TTT TTA GAA GGT
CAT GGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG 3'

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Hoechst Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: -
- (C) ORT: Frankfurt
- (D) BUNDESLAND: -
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 65926
- (G) TELEPHON: 069-305-7072
- (H) TELEFAX: 069-35-7175
- (I) TELEX: -

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zum Screening von antimykotisch wirkenden Substanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 37

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAGAGAGAGA GAGAGAGAGA ACTAGXXXXX XTNTTTTTTTT TTTTTTTTTT

50

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

41

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..13

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

XXXXXXGGCAC GAG

13

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..24

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCGGCCGCAA GGCCTCCATG GCCG

24

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

42

- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
 (B) LAGE: 1..32

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GATCCGGCCA TGGAGGCCTT GCGGCCGCTG CA

32

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
 (B) LAGE: 1..37

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ATCTGCAGCG GCCGCGTTTT AAGAGCTTGG TGAGCGC

37

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
 (B) LAGE: 1..41

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ATGGATCCGG CCATGGAGGC CTCGTTCAGA ATGACACGTA T

41

43

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 42 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
(B) LAGE: 1..42

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ATGGATCCGG CCATGGAGGC CTGTGGAAT ACTCAGGTAT CG

42

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 40 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
(B) LAGE: 1..40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATCTGCAGCG GCCGCGTCTA CCCTATGAAC ATATTCCATT

40

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 40 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

44

- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
(B) LAGE: 1..40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATCTGCAGCG GCCGCAAACA TGAGAATTGG GTAATAACTG

40

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 47 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
(B) LAGE: 1..47

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ATGGATCCGG CCATGGAGGC CTTCAAGAAT TAGCTTTTCA ATTCATC

47

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 34 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

- (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
(B) LAGE: 1..34

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ATCTGCAGCG GCCGCATTTA ATAGAACAGC ATCG

34

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..38

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

ATGGATCCGG CCATGGAGGC CACACCGCAT AGATCGGC

38

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..19

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AGGCAGACTA CAACTTAGG

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

46

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LAGE: 1..25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CTGAATTCGA TGAGGAGAAG CTAGT

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LAGE: 1..23

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CTTCAAACGC TTGTAAATC TTG

23

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LAGE: 1..25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CAGGATCCGT AGACCATTTT CAGAA

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2973 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..2973

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAAATTC GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT	60
TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAATC CCTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA	120
GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGA CTCCAAC	180
GTCAAAGGGC GAAAAACCGT CTATCAGGGC GATGGCCCAC TACGTGAACC ATCACCTAA	240
TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC	300
CGATTTAGAG CTTGACGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG	360
AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA	420
CCCGCCGCGC TTAATGCGCC GCTACAGGGC GCGTCCCATT CGCCATTGAG GCTGCGCAAC	480
TGTTGGGAAG GCGGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA	540
TGTGCTGCAA GGC GATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA	600
ACGACGGCCA GTGAGCGCGC GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTGGA GCTCCACCGC	660
GGTGGCGCTC TAGAACTAGT GGATCCGGCC ATGGAGGCCT TGCGGCCGCT GCAGGAATTC	720
GATATCAAGC TTATCGATAC CGTCGACCTC GAGGGGGGGC CCGGTACCCA GCTTTTGTTC	780
CCTTTAGTGA GGGTTAATTG CGCGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT TTCCTGTGTG	840
AAATTGTTAT CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAGC	900

CTGGGGTGCC	TAATGAGTGA	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	TTGCGCTCAC	TGCCCCGCTTT	960
CCAGTCGGGA	AACCTGTCGT	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	GGCCAACGCG	CGGGGAGAGG	1020
CGGTTTGCGT	ATTGGGCGCT	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	GACTCGCTGC	GCTCGGTTCGT	1080
TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	ATACGGTTAT	CCACAGAATC	1140
AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAGGCCA	GGAACCGTAA	1200
AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	1260
TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC	AGGCGTTTCC	1320
CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG	CCGCTTACCG	GATACCTGTC	1380
CGCCTTTCTC	CCTTCGGGAA	GCGTGGCGCT	TTCTCATAGC	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	1440
TTCGGTGTAG	GTCGTTCGCT	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	GAACCCCCCG	TTCAGCCCGA	1500
CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	CCGGTAAGAC	ACGACTTATC	1560
GCCACTGGCA	GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG	GCGGTGCTAC	1620
AGAGTTCTTG	AAGTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	1680
CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	AGCTCTTGAT	CCGGCAAACA	1740
AACCACCGCT	GGTAGCGGTG	GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC	GCAGAAAAAA	1800
AGGATCTCAA	GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT	GGAACGAAAA	1860
CTCACGTTAA	GGGATTTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	ATCTTCACCT	AGATCCTTTT	1920
AAATTAAAAA	TGAAGTTTTA	AATCAATCTA	AAGTATATAT	GAGTAAACTT	GGTCTGACAG	1980
TTACCAATGC	TTAATCAGTG	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	TGTCTATTTT	GTTTCATCCAT	2040
AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCG	TGTAGATAAC	TACGATACGG	GAGGGCTTAC	CATCTGGCCC	2100
CAGTGCTGCA	ATGATACCGC	GAGACCCACG	CTCACCGGCT	CCAGATTTAT	CAGCAATAAA	2160
CCAGCCAGCC	GGAAGGGCCG	AGCGCAGAAG	TGGTCCTGCA	ACTTTATCCG	CCTCCATCCA	2220
GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTCG	CCAGTTAATA	GTTTGCACAA	2280
CGTTGTTGCC	ATTGCTACAG	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	TCGTTTGGTA	TGGCTTCATT	2340
CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT	CAAGGCGAGT	TACATGATCC	CCCATGTTGT	GCAAAAAAGC	2400
GGTTAGCTCC	TTCGGTCCTC	CGATCGTTGT	CAGAAGTAAG	TTGGCCGCAG	TGTTATCACT	2460

CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC	2520
TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG	2580
CTCTTGCCCCG GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT	2640
CATCATTGGA AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC	2700
CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG	2760
CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC	2820
ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG	2880
TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT	2940
TCCGCGCACA TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TAA	2973

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4088 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..4088

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAATTC GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT	60
TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAATC CCTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA	120
GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGA CTCCAAC	180
GTCAAAGGGC GAAAAACCGT CTATCAGGGC GATGGCCCAC TACGTGAACC ATCACCCTAA	240
TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC	300
CGATTTAGAG CTTGACGGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG	360
AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA	420

50

CCGCGCGCGC	TTAATGCGCC	GCTACAGGGC	GCGTCCCATT	CGCCATTCAG	GCTGCGCAAC	480
TGTTGGGAAG	GGCGATCGGT	GCGGGCCTCT	TCGCTATTAC	GCCAGCTGGC	GAAAGGGGGA	540
TGTGCTGCAA	GGCGATTAAG	TTGGGTAACG	CCAGGGTTTT	CCCAGTCACG	ACGTTGTAAA	600
ACGACGGCCA	GTGAGCGCGC	GTAATACGAC	TCACTATAGG	GCGAATTGGA	GCTCCACCGC	660
GGTGGCGCTC	TAGAACTAGT	GGATCCGGCC	ATGGAGGCCT	CGTTCAGAAT	GACACGTATA	720
GAATGATGCA	TTACCTTGTC	ATCTTCAGTA	TCATACTGTT	CGTATACATA	CTTACTGACA	780
TTCATAGGTA	TACATATATA	CACATGTATA	TATATCGTAT	GCTGCAGCTT	TAAATAATCG	840
GTGTCACTAC	ATAAGAACAC	CTTTGGTGGA	GGGAACATCG	TTGGTACCAT	TGGGCGAGGT	900
GGCTTCTCTT	ATGGCAACCG	CAAGAGCCTT	GAACGCACTC	TCACTACGGT	GATGATCATT	960
CTTGCTCGC	AGACAATCAA	CGTGGAGGGT	AATTCTGCTA	GCCTCTGCAA	AGCTTTC AAG	1020
AAAATGCGGG	ATCATCTCGC	AAGAGAGATC	TCCTACTTTC	TCCCTTTGCA	AACCAAGTTC	1080
GACAACTGCG	TACGGCCTGT	TCGAAAGATC	TACCACCGCT	CTGGAAAGTG	CCTCATCCAA	1140
AGGCGCAAAT	CCTGATCCAA	ACCTTTTTTAC	TCCACGCGCC	AGTAGGGCCT	CTTTAAAAGC	1200
TTGACCGAGA	GCAATCCCGC	AGTCTTCAGT	GGTGTGATGG	TCGTCTATGT	GTAAGTCACC	1260
AATGCACTCA	ACGATTAGCG	ACCAGCCGGA	ATGCTTGGCC	AGAGCATGTA	TCATATGGTC	1320
CAGAAACCCT	ATACCTGTGT	GGACGTTAAT	CACTTGCGAT	TGTGTGGCCT	GTTCTGCTAC	1380
TGCTTCTGCC	TCTTTTTCTG	GGAAGATCGA	GTGCTCTATC	GCTAGGGGAC	CACCCTTTAA	1440
AGAGATCGCA	ATCTGAATCT	TGGTTTCATT	TGTAATACGC	TTTACTAGGG	CTTCTGCTC	1500
TGTCATCTTT	GCCTTCGTTT	ATCTTGCCCTG	CTCATTTTTT	AGTATATTCT	TCGAAGAAAT	1560
CACATTACTT	TATATAATGT	ATAATTCATT	ATGTGATAAT	GCCAATCGCT	AAGAAAAAAA	1620
AAGAGTCATC	CGCTAGGGGA	AAAAAAAAAAA	TGAAAATCAT	TACCGAGGCA	TAAAAAATA	1680
TAGAGTGTAC	TAGAGGAGGC	CAAGAGTAAT	AGAAAAAGAA	AATTGCGGGA	AAGGACTGTG	1740
TTATGACTTC	CCTGACTAAT	GCCGTGTTCA	AACGATACCT	GGCAGTGA CT	CCTAGCGCTC	1800
ACCAAGCTCT	TAAAACGCGG	CCGCTGCAGG	AATTCGATAT	CAAGCTTATC	GATACCGTCG	1860
ACCTCGAGGG	GGGGCCCCGT	ACCCAGCTTT	TGTTCCCTTT	AGTGAGGGTT	AATTGCGCGC	1920
TTGGCGTAAT	CATGGTCATA	GCTGTTTCCT	GTGTGAAATT	GTTATCCGCT	CACAATTCCA	1980

CACAACATAC GAGCCGGAAG CATAAAGTGT AAAGCCTGGG GTGCCTAATG AGTGAGCTAA	2040
CTCACATTAA TTGCGTTGCG CTCCTGCCC GCTTTCCAGT CGGGAAACCT GTCGTGCCAG	2100
CTGCATTAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGGG AGAGGCGGTT TGCCTATTGG GCGCTCTTCC	2160
GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCGGC TCGGCGAGC GGTATCAGCT	2220
CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG	2280
TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAGG CCGCGTTGCT GCGGTTTTTC	2340
CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA	2400
AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT	2460
CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG	2520
GCGCTTTCTC ATAGCTCAG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG	2580
CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCGGTTTCCG CCGGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACAT	2640
CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC	2700
AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC	2760
TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC	2820
GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT	2880
TTTGTGTCAG AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC	2940
TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG	3000
AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA	3060
ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA	3120
CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTTCC CGTCGTGTAG	3180
ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC	3240
CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC	3300
AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT	3360
AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC	3420
GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG	3480
CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GTCCTTCGG TCCTCCGATC	3540

```

GTTGTCAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT      3600
TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG      3660
TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT      3720
AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG      3780
CGAAAACCTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA      3840
CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA      3900
AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC      3960
TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA      4020
TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCGCG GCACATTTC CCGAAAAGTG      4080
CCACCTAA                                         4088

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4583 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LÄNGE: 1..4583

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

```

ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAAATTC GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT      60
TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAATC CCTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA      120
GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGAATCCAAC      180
GTCAAAGGGC GAAAAACCGT CTATCAGGGC GATGGCCAC TACGTGAACC ATCACCTTAA      240
TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC      300
CGATTTAGAG CTTGACGGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG      360

```

AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA	420
CCCGCCGCGC TTAATGCGCC GCTACAGGGC GCGTCCCATT CGCCATTTCAG GCTGCGCAAC	480
TGTTGGGAAG GCGGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA	540
TGTGCTGCAA GCGGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA	600
ACGACGGCCA GTGAGCGCGC GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTGGA GCTCCACCGC	660
GGTGGCGCTC TAGAACTAGT GGATCCGGCC ATGGAGGCCT GTGGGAATAC TCAGGTATCG	720
TAAGATGCAA GAGTTCGAAT CTCTTAGCAA CCATTATTTT TTCCTCAAC ATAACGAGAA	780
CACACAGGGG CGCTATCGCA CAGAATCAAA TTCGATGACT GGAAATTTTT TGTTAATTTT	840
AGAGGTCGCC TGACGCATAT ACCTTTTTTCA ACTGAAAAAT TGGGAGAAAA AGGAAAGGTG	900
AGAGGCCGGA ACCGGCTTTT CATATAGAAT AGAGAAGCGT TCATGACTAA ATGCTTGCAT	960
CACAATACTT GAAGTTGACA ATATTATTTA AGGACCTATT GTTTTTTCCA ATAGGTGGTT	1020
AGCAATCGTC TTACTTTCTA ACTTTTCTTA CCTTTTACAT TTCAGCAATA TATATATATA	1080
TTTCAAGGAT ATACCATTCT AATGTCTGCC CCTATGTCTG CCCCTAAGAA GATCGTCGTT	1140
TTGCCAGGTG ACCACGTTGG TCAAGAAATC ACAGCCGAAG CCATTAAGGT TCTTAAAGCT	1200
ATTTCTGATG TTCGTTCCAA TGTCAGTTC GATTTGAAA ATCATTTAAT TGGTGGTGCT	1260
GCTATCGATG CTACAGGTGT CCCACTTCCA GATGAGGCGC TGAAGCCTC CAAGAAGGTT	1320
GATGCCGTTT TGTTAGGTGC TGTGGGTGGT CCTAAATGGG GTACAGGTAG TGTTAGACCT	1380
GAACAAGGTT TACTAAAAAT CCGTAAAGAA CTTCAATTGT ACGCCAACTT AAGACCATGT	1440
AACTTTGCAT CCGACTCTCT TTAGACTTA TCTCCAATCA AGCCACAATT TGCTAAAGGT	1500
ACTGACTTCG TTGTTGTCAG AGAATTAGTG GGAGGTATTT ACTTTGGTAA GAGAAAGGAA	1560
GACGATGGTG ATGGTGTGCG TTGGGATAGT GAACAATACA CCGTTCAGA AGTGCAAAGA	1620
ATCACAAGAA TGGCCGCTTT CATGGCCCTA CAACATGAGC CACCATTGCC TATTTGGTCC	1680
TTGGATAAAG CTAATGTTTT GGCCTCTTCA AGATTATGGA GAAAACTGT GGAGGAAACC	1740
ATCAAGAACG AATTCCTAC ATTGAAGGTT CAACATCAAT TGATTGATTC TGCCGCCATG	1800
ATCCTAGTTA AGAACCCAAC CCACCTAAAT GGTATTATAA TCACCAGCAA CATGTTGGT	1860
GATATCATCT CCGATGAAGC CTCCGTTATC CCAGGTTTCT TGGGTTTGTT GCCATCTGCG	1920

TCCTTGGCCT	CTTTGCCAGA	CAAGAACACC	GCATTTGGTT	TGTACGAACC	ATGCCACGGT	1980
TCTGCTCCAG	ATTTGCCAAA	GAATAAGGTT	GACCCTATCG	CCACTATCTT	GTCTGCTGCA	2040
ATGATGTTGA	AATTGTCATT	GAAGTTGCCT	GAAGAAGGTA	AGGCCATTGA	AGATGCAGTT	2100
AAAAAGGTTT	TGGATGCAGG	TATCAGAACT	GGTGATTTAG	GTGGTTCCAA	CAGTACCACC	2160
GAAGTCGGTG	ATGCTGTCGC	CGAAGAAGTT	AAGAAAATCC	TTGCTTAAAA	AGATTCTCTT	2220
TTTTTATGAT	ATTTGTACAT	AACTTTTATA	AATGAAATTC	ATAATAGAAA	CGACACGAAA	2280
TTACAAAATG	GAATATGTTT	ATAGGGTAGA	CGCGGCCGCT	GCAGGAATTC	GATATCAAGC	2340
TTATCGATAC	CGTCGACCTC	GAGGGGGGGC	CCGGTACCCA	GCTTTTGTTT	CCTTTAGTGA	2400
GGGTAAATTG	CGCGCTTGGC	GTAATCATGG	TCATAGCTGT	TTCCTGTGTG	AAATTGTTAT	2460
CCGCTCACAA	TTCCACACAA	CATACGAGCC	GGAAGCATAA	AGTGTAAGC	CTGGGGTGCC	2520
TAATGAGTGA	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	TTGCGCTCAC	TGCCCGCTTT	CCAGTCGGGA	2580
AACCTGTCGT	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	GGCCAACGCG	CGGGGAGAGG	CGGTTTGCGT	2640
ATTGGGCGCT	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	GACTCGCTGC	GCTCGGTCGT	TCGGCTGCGG	2700
CGAGCGGTAT	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	ATACGGTTAT	CCACAGAATC	AGGGGATAAC	2760
GCAGGAAAGA	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAGGCCA	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG	2820
TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TCGACGCTCA	2880
AGTCAGAGGT	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC	AGGCGTTTCC	CCCTGGAAGC	2940
TCCCTCGTGC	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG	CCGCTTACCG	GATACCTGTC	CGCCTTTCTC	3000
CCTTCGGGAA	GCGTGGCGCT	TTCTCATAGC	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTCGGTGTAG	3060
GTCGTTCGCT	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	GAACCCCCCG	TTCAGCCCGA	CCGCTGCGCC	3120
TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	CCGGTAAGAC	ACGACTTATC	GCCACTGGCA	3180
GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG	GCGGTGCTAC	AGAGTTCTTG	3240
AAGTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	3300
AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	AGCTCTTGAT	CCGGCAAACA	AACCACCGCT	3360
GGTAGCGGTG	GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC	GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA	3420
GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT	GGAACGAAAA	CTCACGTAA	3480

55

GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA	3540
TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC	3600
TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGTTGCCTGA	3660
CTCCCCGTCG TG TAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGCTGCA	3720
ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC	3780
GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT	3840
TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC	3900
ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT	3960
TCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAGC GGTTAGCTCC	4020
TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGAG TGTATCACT CATGGTTATG	4080
GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTT TGTGACTGGT	4140
GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCC	4200
GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA	4260
AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTGAGATC CAGTTCGATG	4320
TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG	4380
TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT	4440
TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC	4500
ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA	4560
TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TAA	4583

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 4102 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LAGE: 1..4102

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAAATTC GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT	60
TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAATC CCTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA	120
GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGACTCCAAC	180
GTCAAAGGGC GAAAAACCGT CTATCAGGGC GATGGCCCAC TACGTGAACC ATCACCTTAA	240
TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC	300
CGATTTAGAG CTTGACGGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG	360
AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA	420
CCCGCCGCGC TTAATGCGCC GCTACAGGGC GCGTCCCATT CGCCATTTCAG GCTGCGCAAC	480
TGTTGGGAAG GCGGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA	540
TGTGCTGCAA GCGGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA	600
ACGACGGCCA GTGAGCGCGC GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTGGA GCTCCACCGC	660
GGTGGCGCTC TAGAACTAGT GGATCCGGCC ATGGAGGCCT TCAAGAATTA GCTTTTCAAT	720
TCAATTCATC ATTTTTTTTT TATTCTTTTT TTTGATTTTC GTTTCTTTGA AATTTTTTTG	780
ATTCGGTAAT CTCCGAACAG AAGGAAGAAC GAAGGAAGGA GCACAGACTT AGATTGGTAT	840
ATATACGCAT ATGTAGTGTT GAAGAAACAT GAAATTGCCC AGTATTCTTA ACCCAACTGC	900
ACAGAACAAA AACATGCAGG AAACGAAGAT AAATCATGTC GAAAGCTACA TATAAGGAAC	960
GTGCTGCTAC TCATCCTAGT CCTGTTGCTG CCAAGCTATT TAATATCATG CACGAAAAGC	1020
AAACAAACTT GTGTGCTTCA TTGGATGTTT GTACCACCAA GGAATTACTG GAGTTAGTTG	1080
AAGCATTAGG TCCCAAAATT TGTTTACTAA AAACACATGT GGATATCTTG ACTGATTTTT	1140
CCATGGAGGG CACAGTTAAG CCGCTAAAGG CATTATCCGC CAAGTACAAT TTTTACTCT	1200
TCGAAGACAG AAAATTTGCT GACATTGGTA ATACAGTCAA ATTGCAGTAC TCTGCGGGTG	1260
TATACAGAAT AGCAGAATGG GCAGACATTA CGAATGCACA CCGTGTGGTG GGCCAGGTA	1320
TTGTTAGCGG TTTGAAGCAG GCGGCAGAAG AAGTAACAAA GGAACCTAGA GGCCTTTTGA	1380

TGTTAGCAGA	ATTGTCATGC	AAGGGCTCCC	TATCTACTGG	AGAATATACT	AAGGGTACTG	1440
TTGACATTGC	GAAGAGCGAC	AAAGATTTTG	TTATCGGCTT	TATTGCTCAA	AGAGACATGG	1500
GTGGAAGAGA	TGAAGGTTAC	GATTGGTTGA	TTATGACACC	CGGTGTGGGT	TTAGATGACA	1560
AGGGAGACGC	ATTGGGTCAA	CAGTATAGAA	CCGTGGATGA	TGTGGTCTCT	ACAGGATCTG	1620
ACATTATTAT	TGTTGGAAGA	GGACTATTTG	CAAAGGGAAG	GGATGCTAAG	GTAGAGGGTG	1680
AACGTTACAG	AAAAGCAGGC	TGGGAAGCAT	ATTTGAGAAG	ATGCGGCCAG	CAAACTAAA	1740
AAACTGTATT	ATAAGTAAAT	GCATGTATAC	TAAACTCACA	AATTAGAGCT	TCAATTTAAT	1800
TATATCAGTT	ATTACCCAAT	TCTCATGTTT	GCGGCCGCTG	CAGGAATTCG	ATATCAAGCT	1860
TATCGATACC	GTCGACCTCG	AGGGGGGGCC	CGGTACCCAG	CTTTTGTTC	CTTTAGTGAG	1920
GGTTAATTGC	GCGCTTGGCG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	AATTGTTATC	1980
CGCTCACAAAT	TCCACACAAC	ATACGAGCCG	GAAGCATAAA	GTGTAAAGCC	TGGGGTGCCT	2040
AATGAGTGAG	CTAACTCACA	TTAATTGCGT	TGCGCTCACT	GCCCGCTTTC	CAGTCGGGAA	2100
ACCTGTCGTG	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACGCGC	GGGGAGAGGC	GGTTTGCGTA	2160
TTGGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACTG	ACTCGCTGCG	CTCGGTCGTT	CGGCTGCGGC	2220
GAGCGGTATC	AGCTCACTCA	AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	2280
CAGGAAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	2340
TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	2400
GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	2460
CCCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTCTCC	2520
CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT	TCTCATAGCT	CACGCTGTAG	GTATCTCAGT	TCGGTGTAGG	2580
TCGTTGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AACCCCCCGT	TCAGCCCGAC	CGCTGCGCCT	2640
TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	2700
CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG	CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	2760
AGTGGTGGCC	TAACTACGGC	TACACTAGAA	GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	2820
AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	CGGCAAACAA	ACCACCGCTG	2880
GTAGCGGTGG	TTTTTTTGTT	TGCAAGCAGC	AGATTACGCG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	2940

AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAC	TCACGTTAAG	3000
GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA	GATCCTTTTA	AATTAAAAAT	3060
GAAGTTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	3120
TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT	GTCTATTTTG	TTCATCCATA	GTTGCCTGAC	3180
TCCCCGTCGT	GTAGATAACT	ACGATACGGG	AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	3240
TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	CAGATTTATC	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	3300
GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCCGC	CTCCATCCAG	TCTATTAATT	3360
GTTGCCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCGC	CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	3420
TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	TCACGCTCGT	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	3480
CCCAACGATC	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	CAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	3540
TCGGTCCTCC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCCGCAGT	GTTATCACTC	ATGGTTATGG	3600
CAGCACTGCA	TAATTCTCTT	ACTGTCATGC	CATCCGTAAG	ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	3660
AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	GTATGCGGCG	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCCG	3720
CGTCAATACG	GGATAATACC	GCGCCACATA	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	3780
AACGTTCTTC	GGGGCGAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTCGATGT	3840
AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	GTTTCTGGGT	3900
GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAAGGGAAT	AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	3960
GAATACTCAT	ACTCTTCCTT	TTTCAATATT	ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	TATTGTCTCA	4020
TGAGCGGATA	CATATTTGAA	TGTATTTAGA	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	CCGCGCACAT	4080
TTCCCCGAAA	AGTGCCACCT	AA				4102

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 3956 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon

(B) LAGE: 1..3956

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

ATTGTAAGCG TTAATATTTT GTTAAAATTC GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT	60
TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAATC CTTATAAAT CAAAAGAATA GACCGAGATA	120
GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG AGTCCACTAT TAAAGAACGT GGACTCCAAC	180
GTCAAAGGGC GAAAAACCGT CTATCAGGGC GATGGCCAC TACGTGAACC ATCACCTAA	240
TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCTAA AGGGAGCCCC	300
CGATTTAGAG CTTGACGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG	360
AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT AACCACCACA	420
CCCGCCGCGC TTAATGCGCC GCTACAGGGC GCGTCCCATT CGCCATTCAG GCTGCGCAAC	480
TGTTGGGAAG GCGGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA	540
TGTGCTGCAA GCGGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA	600
ACGACGGCCA GTGAGCGCGC GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTGGA GCTCCACCGC	660
GGTGGCGCTC TAGAACTAGT GGATCCGGCC ATGGAGGCCA CACCGCATAG ATCGGCAAGT	720
GCACAAACAA TACTTAAATA AATACTACTC AGTAATAACC TATTTCTTAG CATTTTGTAC	780
GAAATTTGCT ATTTTGTAG AGTCTTTTAC ACCATTTGTC TCCACACCTC CGCTTACATC	840
AACACCAATA ACGCCATTTA ATCTAAGCGC ATCACCAACA TTTTCTGGCG TCAGTCCACC	900
AGCTAACATA AAATGTAAGC TTTCGGGGCT CTCTTGCTT CCAACCCAGT CAGAAATCGA	960
GTTCCAATCC AAAAGTTCAC CTGTCCCACC TGCTTCTGAA TCAAACAAGG GAATAAACGA	1020
ATGAGGTTTC TGTGAAGCTG CACTGAGTAG TATGTTGCAG TCTTTTGGA ATACGAGTCT	1080
TTTAATAACT GGCAAACCGA GGAACCTTG GTATTCTTGC CAGACTCAT CTCCATGCAG	1140
TTGGACGATA TCAATGCCGT AATCATTGAC CAGAGCCAAA ACATCCTCCT TAGGTTGATT	1200
ACGAAACACG CCAACCAAGT ATTTGGAGT GCCTGAACTA TTTTATATG CTTTACAAG	1260
ACTTGAAATT TTCCTTGCAA TAACCGGGTC AATTGTTCTC TTTCTATTGG GCACACATAT	1320

AATACCCAGC	AAGTCAGCAT	CGGAATCTAG	AGCACATTCT	GCGGCCTCTG	TGCTCTGCAA	1380
GCCGCAAAC	TTCACCAATG	GACCAGAACT	ACCTGTGAAA	TTAATAACAG	ACATACTCCA	1440
AGCTGCCTTT	GTGTGCTTAA	TCACGTATAC	TCACGTGCTC	AATAGTCACC	AATGCCCTCC	1500
CTCTTGGCCC	TCTCCTTTTC	TTTTTTCGAC	CGAATTAATT	CTTAATCGGC	AAAAAAGAA	1560
AAGCTCCGGA	TCAAGATTGT	ACGTAAGGTG	ACAAGCTATT	TTTCAATAAA	GAATATCTTC	1620
CACTACTGCC	ATCTGGCGTC	ATAACTGCAA	AGTACACATA	TATTACGATG	CTGTTCTATT	1680
AAATGCGGCC	GCTGCAGGAA	TTGATATCA	AGCTTATCGA	TACCGTCGAC	CTCGAGGGGG	1740
GGCCCGGTAC	CCAGCTTTTG	TTCCCTTTAG	TGAGGGTTAA	TTGCGCGCTT	GGCGTAATCA	1800
TGGTCATAGC	TGTTTCCTGT	GTGAAATTGT	TATCCGCTCA	CAATTCCACA	CAACATACGA	1860
GCCGGAAGCA	TAAAGTGTA	AGCCTGGGGT	GCCTAATGAG	TGAGCTAACT	CACATTAATT	1920
GCGTTGCGCT	CACTGCCCGC	TTTCCAGTCG	GGAAACCTGT	CGTGCCAGCT	GCATTAATGA	1980
ATCGGCCAAC	GCGCGGGGAG	AGGCGGTTTG	CGTATTGGGC	GCTCTTCCGC	TTCTCGCTC	2040
ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT	CGTTCGGCTG	CGGCGAGCGG	TATCAGCTCA	CTCAAAGGCG	2100
GTAATACGGT	TATCCACAGA	ATCAGGGGAT	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC	2160
CAGCAAAAGG	CCAGGAACCG	TAAAAAGGCC	GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	2220
CCCCCTGACG	AGCATCACAA	AAATCGACGC	TCAAGTCAGA	GGTGGCGAAA	CCCGACAGGA	2280
CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT	TCCCCCTGGA	AGCTCCCTCG	TGCGCTCTCC	TGTTCCGACC	2340
CTGCCGCTTA	CCGGATACCT	GTCCGCCTTT	CTCCCTTCGG	GAAGCGTGGC	GCTTTCTCAT	2400
AGCTCACGCT	GTAGGTATCT	CAGTTCGGTG	TAGGTCGTTT	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG	2460
CACGAAACCC	CCGTTACAGC	CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAACATATG	TCTTGAGTCC	2520
AACCCGGTAA	GACACGACTT	ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	2580
GCGAGGTATG	TAGGCGGTGC	TACAGAGTTC	TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA	CGGCTACACT	2640
AGAAGGACAG	TATTTGGTAT	CTGCGCTCTG	CTGAAGCCAG	TTACCTTCGG	AAAAAGAGTT	2700
GGTAGCTCTT	GATCCGGCAA	ACAAACCACC	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTT	TGTTTGCAAG	2760
CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA	AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT	TTCTACGGGG	2820
TCTGACGCTC	AGTGGAACGA	AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA	2880

AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA	2940
TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG	3000
ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGAATCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA	3060
CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG	3120
GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT	3180
GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT	3240
TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC	3300
TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCTAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA	3360
TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAGT	3420
AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATC TCTTACTGTC	3480
ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA	3540
TAGTGATGCG GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA	3600
CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGGCG AAAACTCTCA	3660
AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT	3720
TCAGCATCTT TACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC	3780
GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA	3840
TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT	3900
TAGAAAATA AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTAA	3956

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

62

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..59

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

ATAGGCGCTT CTCGTATCTA TACTCAACCC GCCCCCAATG CAGCTGAAGC TTCGTACGC 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..62

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

AAATTGGGGG CACAAATGAG GGGTAAAAAT GCAGACATTA GCATAGGCCA CTAGTGGATC 60

TG 62

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..59

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

TCTAAATCGT TATGTTGAAA ACCTAGGCAC CAATGTGACT CAGCTGAAGC TTCGTACGC 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..62

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

CAGCTTTTGC CCAATATGCT CAAAACCGAG TTATCTATTA GCATAGGCCA CTAGTGGATC 60

TG 62

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..59

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

CAAGTTACTT TGAAAGGAAA TAAAAAAAAT TGTCAGCATG CAGCTGAAGC TTCGTACGC 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure

- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..62

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

ATATTTGATG CAATTTCTGC CTAAAGTAC AAAATGCTTA GCATAGGCCA CTAGTGGATC 60

TG 62

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..59

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

AATATTCATA AAACAGGATC TTTCAAGGGA CGATAAAATG CAGCTGAAGC TTCGTACGC 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

65

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..62

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

TTCCTATTTT ATTGTACAAA ATGCGCGACT ATTCCGTTTA GCATAGGCCA CTAGTGGATC 60

TG 62

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..59

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

TCAATCGAAG CATTTGAAGC ATACTCTAGA CCAAAGAAGA CAGCTGAAGC TTCGTACGC 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..62

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

TTGAATTCAA GACAAAAAAT CAAATCTTGC TGAGTTGTTA GCATAGGCCA CTAGTGGATC 60

TG

62

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..59

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

GAAGCCTGGC TATACCAATC CGGCTTTAAA AGCCCTTGGT CAGCTGAAGC TTCGTACGC 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..62

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

CTTTACCCTG TTTGACCCAG TTCTGTGGCC AATCTTTTTC GCATAGGCCA CTAGTGGATC 60

TG

62

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare

67

- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..59

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

TTCCTAAAAG TAATTCTTAA AAGTGATAAT GAATGACTTA CAGCTGAAGC TTCGTACGC 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..62

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

ACCTAGTTGA AAAGATTTGT TCCGCAGATA AGAAAAAATG GCATAGGCCA CTAGTGGATC 60

TG 62

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

68

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..59

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

CACAGGGCCG CATTATTTCT TTGATTTTCGT TTTTTCACC CAGCTGAAGC TTCGTACGC 59

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..62

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

GATTTAGAGA TTCAAACCTCC GTTATTTTGA GAAGGTCATG GCATAGGCCA CTAGTGGATC 60

TG 62

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Auffinden von antimykotisch wirkenden Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) eine Nukleinsäure, die die Expression eines essentiellen Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* kontrolliert und/oder die für ein essentielles Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* oder einen Teil desselben kodiert oder das kodierte essentielle Protein selbst oder
 - b) eine andere Nukleinsäure, die die Expression eines zu dem unter a) genannten Proteins funktionsähnlichen Proteins aus einer anderen Mycetenspezies kontrolliert und/oder die für ein zu dem unter a) genannten Protein funktionsähnlichen Protein aus einer anderen Mycetenspezies kodiert oder das kodierte funktionsähnliche Protein selbstals Target eingesetzt wird, wobei dann entweder
 - a) der Effekt einer zu untersuchenden Substanz auf die Expression des essentiellen Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* oder die funktionelle Aktivität des kodierten essentiellen Proteins selbst oder
 - b) der Effekt einer zu untersuchenden Substanz auf die Expression des funktionsähnlichen Proteins selbst aus einer anderen Mycetenspezies oder die funktionelle Aktivität des kodierten funktionsähnlichen Proteins bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nukleinsäure ein essentielles Gen ist.
3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 2, wobei das Gen ausgewählt wird aus der Gruppe der Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei die andere Nukleinsäure ein Gen aus einer anderen Mycetenspezies ist, welches zu einem der Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w

funktionsähnlich ist.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäure der Promotor eines essentiellen Gens ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Promotor ausgewählt wird aus der Reihe der Promotoren der Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das essentielle Protein durch eines der Gene ausgewählt aus YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w kodiert wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Protein aus einer anderen Mycetenspezies zu einem essentiellen Protein, das durch eines der Gene ausgewählt aus YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w kodiert wird, funktionsähnlich ist.
9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, wobei die andere Mycetenspezies ausgewählt wird aus den Basidiomyceten, Ascomyceten und Hyphomyceten.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, wobei die andere Mycetenspezies ausgewählt wird aus Hemiascomycetales (Hefen), Plectascales (Schimmelpilze), Gymnascales (Haut- und Haarpilze), Conidiosporales (Hautpilze), Thallosporales (Sproßpilze), Mucor, Rhizopus, Coccidioides, Paracoccidioides (brasiliensis) (Blasomyces brasiliensis), Endomyces

(Blastomyces), Aspergillus, Penicillium (Scopulariopsis), Trichophyton (Ctenomyces), Epidermophyton, Microsporon, Piedraia, Hormodendron, Phialophora, Sporotrichon, Cryptococcus, Candida, Geotrichum und Trichosporon.

11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, wobei die andere Mycetenspezies ausgewählt wird aus *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* und *Sporothrix schenckii*.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, wobei eine Zelle bereitgestellt wird, die ein essentielles Gen von *Saccharomyces cerevisiae* oder ein funktionsähnliches Gen aus einer anderen Mycetenspezies überexprimiert, diese Zelle mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wird und die wachstumshemmende Wirkung dieser Substanz bestimmt wird.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, wobei mindestens zwei Zellen bereitgestellt werden, die ein essentielles Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* oder ein funktionsähnliches Gen aus einer anderen Mycetenspezies in unterschiedlichem Maße exprimieren, diese Zellen mit einer zu untersuchenden Substanz inkubiert werden und die wachstumshemmende Wirkung dieser Substanz vergleichend bestimmt wird.
14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, wobei die Zellen *Saccharomyces cerevisiae* Zellen des Stammes CEN.PK2 oder Derivate desselben sind.
15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Zellen haploide *Saccharomyces cerevisiae* Zellen sind.
16. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, wobei ein funktionsähnliches Gen in einer anderen Mycetenspezies dadurch identifiziert wird, daß
 - a) *Saccharomyces cerevisiae* Zellen erzeugt werden, in denen ein essentielles Gen von *Saccharomyces cerevisiae* unter die Kontrolle eines regulierbaren Promotors gestellt wird,
 - b) die auf diese Weise veränderten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen unter Wachstumsbedingungen angezogen werden, unter denen der regulierbare

- Promotor aktiv ist,
- c) die veränderten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen mit cDNA, hergestellt aus der anderen Mycetenspezies und vorliegend in einem Expressionsvektor, transformiert werden,
 - d) der regulierbare Promotor durch Veränderung der Kulturbedingungen abgeschaltet wird, so daß nur die *Saccharomyces cerevisiae* Zellen überleben, in denen die cDNA, die für ein funktionsähnliches Protein in der anderen Mycetenspezies kodiert, exprimiert wird und
 - e) die cDNA, die das zu dem essentiellen Gen von *Saccharomyces cerevisiae* funktionsähnliche Gen in der anderen Mycetenspezies repräsentiert, gegebenenfalls isoliert und analysiert wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das essentielle Gen von *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt wird aus der Gruppe der Gene YGR046w, YGR048w, YGR060w, YJL074c, YJR136c, YJR141w, YBR167c, YPL252c, YPL242c, YOR119c, YPL235w, YOR110w, YNL182c, YOR206w, YJL054w, YJL039c, YNL258c, YNL245c, YNL038w, YNL251c, YNL256w, YNL260c, YIR012w, YLR086w, YLR076c, YLR100w, YIR010w, YIL003w, YBR102c, YOL010w, YKL013c, YKL018w und YLL003w.
18. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 und 17, wobei die *Saccharomyces cerevisiae* Zellen des Stammes CEN.PK2 sind.
19. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 18, wobei *Saccharomyces cerevisiae* Zellen erzeugt werden, in deren Genom der native Promotor des essentiellen Gens durch einen regulierbaren Promotor ersetzt wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei *Saccharomyces cerevisiae* Zellen, bei denen eines der essentiellen Gene durch ein Markergen ersetzt ist, mit einem rekombinanten Expressionsvektor, der den kodierenden Teil des essentiellen *Saccharomyces cerevisiae* Gens unter der Kontrolle eines regulierbaren Promotors enthält, transformiert werden.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 und 20, wobei die *Saccharomyces cerevisiae* heterozygot-diploid sind.
22. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 19 bis 21, wobei in den heterozygot-diploiden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ein essentielle Gen durch

ein Gen, das für einen Auxotrophiemarker kodiert, ersetzt ist.

23. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 19 bis 21, wobei in den heterozygot-diploiden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ein essentielles Gen durch ein Resistenzgen ersetzt ist.
24. Verfahren nach Anspruch 19, wobei *Saccharomyces cerevisiae* Zellen erzeugt werden, bei denen der native Promoter des essentiellen Gens extrachromosomal durch einen regulierbaren Promotor ersetzt wird.
25. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 24, wobei die *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ausgewählt werden aus Zellen der Stämme CEN.EN27, CEN.EN28, CEN.EN8, CEN.RO23, CEN.RO30, CEN.RO6, CEN.RO8, CEN.SR14, CEN.SR15, CEN.SR2, CEN.SR26, CEN.SR41, CEN.SR55, CEN.SR66, CEN.SR80, CEN.SR81, CEN.HE1, CEN.HE17, CEN.HE18, CEN.HE2, CEN.HE4, CEN.HE9, CEN.HI10, CEN.HI23, CEN.HI28, CEN.HI31, CEN.HI5, CEN.HI7, CEN.FE8, CEN.KR28, CEN.TS02, CEN.TS04 und CEN.ZI26.
26. *Saccharomyces cerevisiae* Zellen der Stämme CEN.EN27, CEN.EN28, CEN.EN8, CEN.RO23, CEN.RO30, CEN.RO6, CEN.RO8, CEN.SR14, CEN.SR15, CEN.SR2, CEN.SR26, CEN.SR41, CEN.SR55, CEN.SR66, CEN.SR80, CEN.SR81, CEN.HE1, CEN.HE17, CEN.HE18, CEN.HE2, CEN.HE4, CEN.HE9, CEN.HI10, CEN.HI23, CEN.HI28, CEN.HI31, CEN.HI5, CEN.HI7, CEN.FE8, CEN.KR28, CEN.TS02, CEN.TS04 und CEN.ZI26 nach Anspruch 25.
27. Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen der Stämmen nach Anspruch 25 in einem Verfahren zur Identifizierung von funktionsähnlichen Genen in anderen Mycetenspezies.
28. Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen nach einem oder mehreren der Ansprüche 26 und 27 zur Identifizierung von funktionsähnlichen Genen in *Candida albicans* und *Aspargillus fumigatus*.
29. Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen nach Anspruch 26 zur Identifizierung von funktionsähnlichen menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Genen.
30. Verwendung von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen nach Anspruch 26 in einem

Verfahren zur Identifizierung von antimykotisch wirkenden Substanzen.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die essentiellen Gene von *S. cerevisiae* durch Austausch einzelner Gene im Genom von *S. cerevisiae* gegen Markergene mit Hilfe der Plasmide pPK5/6, pPK7/8, pPK9/10 oder pPK13/14 identifiziert werden.
32. Plasmid pPK5/6 gemäß SEQ ID NO. 18.
33. Plasmid pPK7/8 gemäß SEQ ID NO. 19.
34. Plasmid pPK9/10 gemäß SEQ ID NO. 20.
35. Plasmid pPK13/14 gemäß SEQ ID NO. 21.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/81, 1/19, 15/00, C12Q 1/18, 1/68		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/44135
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Oktober 1998 (08.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01904		KÖTTER, Peter [DE/DE]; Industriestrasse 3A, D-61440 Oberursel (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 2. April 1998 (02.04.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 13 572.2 2. April 1997 (02.04.97) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Brünigstrasse 50, D-65929 Frankfurt am Main (DE).			
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HINNEN, Albert [DE/DE]; Scheidlerstrasse 17, D-07745 Jena (DE). HEGEMANN, Johannes [DE/DE]; In den Gärten 33, D-35398 Giessen (DE). MUNDER, Thomas [DE/DE]; Engelplatz 3, D-07743 Jena (DE). SCHUSTER, Tilmer [DE/DE]; Eichenweg 40, D-97440 Werneck (DE). FELDMANN, Horst [DE/DE]; Pasinger Heuweg 86, D-80999 München (DE). KRAMER, Wilfried [DE/DE]; Strasse an der St. Vinzenz Kirche 10, D-37077 Göttingen (DE). ZIMMERMANN, Friedrich, Karl [DE/DE]; Goethestrasse 12, D-64372 Ober-Ramstadt (DE). ENTIAN, Karl-Dieter [DE/DE]; Oberurseler Strasse 43, D-61440 Oberursel (DE). ROSE, Matthias [DE/DE]; Theodor-Heuss-Strasse 4, D-61267 Neu-Anspach (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 17. Dezember 1998 (17.12.98)	
(54) Title: METHOD FOR SCREENING ANTIMYCOTICALLY ACTIVE SUBSTANCES			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SCREENING VON ANTIMYKOTISCH WIRKENDEN SUBSTANZEN			
(57) Abstract <p>The invention relates to a method for screening antimycotically active substances, whereby essential genes from mycetes, especially of <i>Saccaromyces cerevisiae</i>, and functionally homologous and/or sequentially homologous mycetes genes are used as targets. Said method is thus characterized in that essential genes from mycetes are used as targets.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screening von antimykotisch wirksamen Substanzen, wobei essentielle Gene aus Myceten, insbesondere von <i>Saccaromyces cerevisiae</i> sowie funktionshomologe und/oder sequenzhomologe Mycetengene als Targets eingesetzt werden. Verfahren zum Auffinden von antimykotisch wirkenden Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß essentielle Gene aus Myceten als Targets eingesetzt werden.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire			PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/01904

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C12N15/81 C12N1/19 C12N15/00 C12Q1/18 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 11969 A (RIBOGENE INC), 04 May 1995 (04.05.95), cited in the application see abstract see page 8 - page 13 see page 21, line 14 - line 37 see page 32, line 1 - line 16 see page 33, line 20 - line 37 see page 34, line 26 - line 30 see page 48, line 18 - line 27 see page 65, line 25 - line 70, line 17 see claim 62	1, 2, 5, 9-13, 15, 16, 19-22, 24
Y	---	14, 18, 23
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 1998 (14.08.98)

Date of mailing of the international search report

03 November 1998 (03.11.98)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/01904

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 34678 A (AMERICAN CYANAMID CO), 21 December 1995 (21.12.95), see abstract see page 3, line 22 - line 29 ---	1,12,13,15
X	US 5 614 377 A (BULAWA CHRISTINE E), 25 March 1997 (25.03.97), see abstract see column 5, line 20 - line 44 see examples 4,5 see claim 1 ---	1,13,15
X	EP 0 627 491 A (AMERICAN CYANAMID CO), 7 December 1994 (07.12.94), see abstract see claims 1,2 ---	1,12,15
X	WO 95 06132 A (MYCO PHARM INC; UNIV GEORGIA (US)), 2 March 1995 (02.03.95), see abstract ---	1,2,13,15
Y	GÜLDENER U. ET AL.: "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast", NUCL. ACIDS. RES., Vol. 24, Nr 13, 1996, pages 2519-2524, XP002074211 cited in the application see the whole document ---	14,18,23
A	TUITE M.F.: "Antifungal drug development: the identification of new targets", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Vol. 10, July 1992, pages 235-239, XP002074212 see the whole document ---	1-31
A	VAHLENSIECK H F ET AL: "IDENTIFICATION OF THE YEAST ACC1 GENE PRODUCT (ACETYL-COA CARBOXYLASE) AS THE TARGET OF THE POLYKETIDE FUNGICIDE SORAPHEN A" CURRENT GENETICS, Vol. 25, Nr 2, 1 February 1994 (01.02.94), pages 95-100, XP000196332 see the whole document ---	1-31
A	DATABASE SWISS PROT Accession Nr P53230, 1 October 1996 (01.10.96), ENTIAN K.D. ET AL.: "YGR046W, hypothetical 44.2 kDa protein; from S. cerevisiae chromosome VII" XP002074214 see the whole document ---	3,4,6-8,17, 25-30
A	MUMBERG D. ET AL.: "Regulatable promoters of S. cerevisiae: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression" NUCL. ACIDS RES., Vol. 22, Nr 25, 1994, pages 5767-5768, XP002074213 cited in the application see the whole document ---	12,19
X,P	EP 0 816 511 A (HANS KNOELL INST FUER NATURSTO) 07 January 1998 (07.01.93), see the whole document see examples 4,7,8,10 -----	1,2,12,13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See ADDITIONAL MATTER

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

See Invention 1.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions, as follows:

1. Claims: (1-31) in part

Method for identifying antimycotics characterized in that

- (1) an essential gene in the *S. cerevisiae* genome is inactivated by interruption (or by promoter exchange);
- (2) the inactivated gene [the verb is missing in the German text] by a copy of the same or by a copy of functionally similar gene (optionally to be identified) from another mycete class, whereby
- (3) the replaced gene is expressed in various quantities (under to over-expresses) e.g. on the basis of a regulatable promoter or using plasmids which lead to different copy figures in the cell.

The cited method, wherein the essential inventive YGR046w gene of *S. cerevisiae* in strain CEN.EN27 was interrupted.

Cited strains and the use thereof to identify the gene functionally similar to YGR048w in other mycete classes.

2. Claims: (1-13) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YGR048w and strain CEN.EN8.

3. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YGR060w and strain CEN.R023

4. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YJL074c and strain CEN.R030.

5. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YJR136c and strain CEN.R06.

6. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YJR141w and strain CEN.R08.

7. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YBR167c and strain CEN.SR14.

8. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YPL252c and strain CEN.SR15.

9. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YPL242c and strain CEN.SR2.

10. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YOR119c and strain CEN.SR26.

11. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YPL235w and strain CEN.SR41.

12. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YOR110w and strain CEN.SR55.

13. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YNL182c and strain CEN.SR66.

14. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YOR206w and strain CEN.SR80.

15. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YJL054w and strain CEN.SR81.

16. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YJL039c and strain CEN.HE1.

17. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YNL258c and strain CEN.HE17.

18. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YNL245c and strain CEN.HE18.

19. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YNL038w and strain CEN.HE2.

20. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YJL074c and strain CEN.R030.

21. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YNL256w and strain CEN.HE9.

22. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YNL260c and strain CEN.HI10.

23. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YIR012w and strain CEN.HI23.

24. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YLR086w and strain CEN.HI28.

25. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YLR076c and strain CEN.HI31.

26. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YLR100w and strain CEN.HI5.

27. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YIR10w and strain CEN.HI7.

28. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YIL003w and strain CEN.FE8.

29. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YBR102c and strain CEN.KR28.

30. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YOL010w and strain CEN.TS02.

31. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YKL013c and strain CEN.TS04.

32. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YKL018w and strain CEN.ZI26.

33. Claims: (1-31) in part

Same as subject 1 but relating to Gene YLL003w and strain CEN.EN28.

34. Claims: (32) in full

Newly arising vectors pPk5/6 (seq. ID 18) from pKS(+) suitable for gene interruption in *S. cerevisiae*.

35. Claims: (33) in full

Newly arising vectors pPk7/8 (seq. ID 19) from pKS(+) suitable for gene interruption in *S. cerevisiae*.

36. Claims: (34) in full

Newly arising vectors pPk9/10 (seq. ID 20) from pKS(+) suitable for gene interruption in *S. cerevisiae*.

37. Claims: (35) in full

Newly arising vectors pPk13/14 (seq. ID 21) from pKS(+) suitable for gene interruption in *S. cerevisiae*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/01904

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9511969 A	04-05-1995	AU 686685 B	12-02-1998
		AU 8088494 A	22-05-1995
		EP 0725818 A	14-08-1996
		JP 9504176 T	28-04-1997
		US 5641627 A	24-06-1997
-----	-----	-----	-----
WO 9534678 A	21-12-1995	US 5561051 A	01-10-1996
		AU 2699595 A	05-01-1996
		CA 2194983 A	21-12-1995
		EP 0765400 A	02-04-1997
-----	-----	-----	-----
US 5614377 A	25-03-1997	WO 9523235 A	31-08-1995
-----	-----	-----	-----
EP 0627491 A	07-12-1994	US 5527687 A	18-06-1996
-----	-----	-----	-----
WO 9506132 A	02-03-1995	NONE	
-----	-----	-----	-----
EP 0816511 A	07-01-1998	NONE	
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 98/01904

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/81 C12N1/19 C12N15/00 C12Q1/18 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 11969 A (RIBOGENE INC) 4.Mai 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Seite 8 - Seite 13 siehe Seite 21, Zeile 14 - Zeile 37 siehe Seite 32, Zeile 1 - Zeile 16 siehe Seite 33, Zeile 20 - Zeile 37 siehe Seite 34, Zeile 26 - Zeile 30 siehe Seite 48, Zeile 18 - Zeile 27 siehe Seite 65, Zeile 25 - Seite 70, Zeile 17	1,2,5, 9-13,15, 16, 19-22,24
Y	siehe Anspruch 62 --- -/-	14,18,23



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. August 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03.11.1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Galli, I

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 34678 A (AMERICAN CYANAMID CO) 21.Dezember 1995 siehe Zusammenfassung siehe Seite 3, Zeile 22 - Zeile 29 ---	1,12,13, 15
X	US 5 614 377 A (BULAWA CHRISTINE E) 25.März 1997 siehe Zusammenfassung siehe Spalte 5, Zeile 20 - Zeile 44 siehe Beispiele 4,5 siehe Anspruch 1 ---	1,13,15
X	EP 0 627 491 A (AMERICAN CYANAMID CO) 7.Dezember 1994 siehe Zusammenfassung siehe Ansprüche 1,2 ---	1,12,15
X	WO 95 06132 A (MYCO PHARM INC ;UNIV GEORGIA (US)) 2.März 1995 siehe Zusammenfassung ---	1,2,13, 15
Y	GÜLDENER U. ET AL.: "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast" NUCL. ACIDS. RES., Bd. 24, Nr. 13, 1996, Seiten 2519-2524, XP002074211 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	14,18,23
A	TUITE M.F.: "Antifungal drug development: the identification of new targets" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 10, Juli 1992, Seiten 235-239, XP002074212 siehe das ganze Dokument ---	1-31
A	VAHLENSIECK H F ET AL: "IDENTIFICATION OF THE YEAST ACC1 GENE PRODUCT (ACETYL-COA CARBOXYLASE) AS THE TARGET OF THE POLYKETIDE FUNGICIDE SORAPHEN A" CURRENT GENETICS, Bd. 25, Nr. 2, 1.Februar 1994, Seiten 95-100, XP000196332 siehe das ganze Dokument ---	1-31
A	DATABASE SWISS PROT Accession No. P53230, 1.Oktober 1996 ENTIAN K.D. ET AL.: "YGR046W, hypothetical 44.2 kDa protein; from S. cerevisiae Chromosome VII" XP002074214 siehe das ganze Dokument ---	3,4,6-8, 17,25-30

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MUMBERG D. ET AL.: "Regulatable promoters of <i>S. cerevisiae</i> : comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression" NUCL. ACIDS RES., Bd. 22, Nr. 25, 1994, Seiten 5767-5768, XP002074213 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	12,19
X,P	EP 0 816 511 A (HANS KNOELL INST FUER NATURSTO) 7.Januar 1998 siehe das ganze Dokument siehe Beispiele 4,7,8,10 -----	1,2,12, 13

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

Siehe WEITERE ANGABEN

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Siehe Erfindung 1.

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Methode zur Identifizierung von Antimykotika, dadurch charakterisiert, dass

- (1) ein essentielles Gen im *S. cerevisiae*-Genom durch Unterbrechung (oder durch Promoteraustausch) ausgeschaltet wird;
- (2) das ausgeschaltete Gen durch eine Kopie desselben, oder durch eine Kopie eines funktionsähnlichen (ggf. noch zu identifizierenden) Gen aus einer anderen Myzetenart, wobei
- (3) das ersetzte Gen in verschiedenen Mengen exprimiert wird (Unter- bis Ueberexpression), zum Beispiel anhand eines regulierbaren Promoter oder unter Verwendung von Plasmiden, die in der Zelle zu verschiedene Kopiezahlen führen.

Genannte Methode, wobei das als essentiell erfundene YGR046w Gen von *S. cerevisiae* im Stamm CEN.EN27 unterbrochen wurde.

Genannter Stamm und dessen Verwendung zur Identifizierung des funktionsähnlichen Gen zu YGR046w in anderen Myzetenarten.

2. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YGR048w und Stamm CEN.EN8.

3. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YGR060w und Stamm CEN.R023.

4. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YJL074c und Stamm CEN.R030.

5. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YJR136c und Stamm CEN.R06.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

6. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YJR141w und Stamm
CEN.R08.

7. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YBR167c und Stamm
CEN.SR14.

8. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YPL252c und Stamm
CEN.SR15.

9. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YPL242c und Stamm
CEN.SR2.

10. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YOR119c und Stamm
CEN.SR26.

11. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YPL235w und Stamm
CEN.SR41.

12. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YOR110w und Stamm
CEN.SR55.

13. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YNL182c und Stamm
CEN.SR66.

14. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YOR206w und Stamm
CEN.SR80.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

15. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YJL054w und Stamm
CEN.SR81.

16. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YJL039c und Stamm
CEN.HE1.

17. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YNL258c und Stamm
CEN.HE17.

18. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YNL245c und Stamm
CEN.HE18.

19. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YNL038w und Stamm
CEN.HE2.

20. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YNL251c und Stamm
CEN.HE4.

21. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YNL256w und Stamm
CEN.HE9.

22. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YNL260c und Stamm
CEN.HI10.

23. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YIR012w und Stamm
CEN.HI23.

24. Ansprüche: (1-31) - teilweise

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YLR086w und Stamm
CEN.HI28.

25. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YLR076c und Stamm
CEN.HI31.

26. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YLR100w und Stamm
CEN.HI5.

27. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YIR010w und Stamm
CEN.HI7.

28. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YIL003w und Stamm
CEN.FE8.

29. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YBR102c und Stamm
CEN.KR28.

30. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YOL010w und Stamm
CEN.TS02.

31. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YKL013c und Stamm
CEN.TS04.

32. Ansprüche: (1-31) - teilweise

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YKL018w und Stamm
CEN.ZI26.

33. Ansprüche: (1-31) - teilweise

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Idem wie Subjekt 1, aber betreffend Gen YLL003w und Stamm CEN.EN28.

34. Ansprüche: (32) - vollständig

Zur Genunterbrechung in *S. cerevisiae* geeignete, aus PKS(+)-neu stammende Vektoren pPK5/6 (Seq. ID 18).

35. Ansprüche: (33) - vollständig

Zur Genunterbrechung in *S. cerevisiae* geeignete, aus PKS(+)-neu stammende Vektoren pPK7/8 (Seq. ID 19).

36. Ansprüche: (34) - vollständig

Zur Genunterbrechung in *S. cerevisiae* geeignete, aus PKS(+)-neu stammende Vektoren pPK9/10 (Seq. ID 20).

37. Ansprüche: (35) - vollständig

Zur Genunterbrechung in *S. cerevisiae* geeignete, aus PKS(+)-neu stammende Vektoren pPK13/14 (Seq. ID 21).

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01904

Im Recht nach dem angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9511969 A	04-05-1995	AU 686685 B	12-02-1998
		AU 8088494 A	22-05-1995
		EP 0725818 A	14-08-1996
		JP 9504176 T	28-04-1997
		US 5641627 A	24-06-1997
WO 9534678 A	21-12-1995	US 5561051 A	01-10-1996
		AU 2699595 A	05-01-1996
		CA 2194983 A	21-12-1995
		EP 0765400 A	02-04-1997
US 5614377 A	25-03-1997	WO 9523235 A	31-08-1995
EP 0627491 A	07-12-1994	US 5527687 A	18-06-1996
WO 9506132 A	02-03-1995	KEINE	
EP 0816511 A	07-01-1998	KEINE	

